

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
ANTONIETA LOURENIA GOMES

ESTUDO DA CAPACITAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE BOVINO UTILIZANDO A  
TERAPIA FOTODINÂMICA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HEPARINA

UBERABA, MG

2014

ANTONIETA LOURENIA GOMES

ESTUDO DA CAPACITAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE BOVINO UTILIZANDO A  
TERAPIA FOTODINÂMICA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HEPARINA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

UBERABA, MG

2014

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

**Gomes, Antonieta Lourenia.**

G585e      Estudo da capacitação do espermatozoide bovino utilizando a terapia fotodinâmica e diferentes concentrações de heparina / Antonieta Lourenia Gomes. – Uberaba, 2014.

66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação, 2014.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

1. Fototerapia. 2. Fertilização in vitro. 3. Reprodução animal. 4.

Heparina. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em

Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos

ANTONIETA LOURENIA GOMES

ESTUDO DA CAPACITAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE BOVINO UTILIZANDO A  
TERAPIA FOTODINÂMICA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HEPARINA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Ian Martin  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti  
Universidade Federal de Uberlândia

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a OLORUM!

Ao meu Pai Xangô e minha Mãe Yansã, pelas dádivas e bênçãos, pelas pedras no caminho, pelas lutas e batalhas que me fizeram forte e pelas vitórias conquistadas. Por colocar em meu caminho milhares de anjos que me conduziram até aqui.

E nessa minha longa jornada, começa com minha maravilhosa família, meu pai Antônio, minha mãe Rita, meus irmãos Frederico e Hugo, sem essas pessoas eu nada seria, os amo muito, muito e muito!

Aos inúmeros anjos amigos que conquistei ao longo desta minha caminhada, entre estes não posso deixar de citar o meu querido Mestre Humberto Eustáquio Coelho, o Sr. Roberto Gerônimo, Sra. Marilda e minha tia Ruth, que acreditaram em mim e de alguma forma ter vislumbrado que eu merecia a imensa ajuda, que me permitiram concretizar o sonho da graduação em Medicina Veterinária e hoje, chegando a Mestre! Meu muito obrigada!

Ao meu orientador André Belico, pela paciência e gentileza de um grande mestre, em me orientar e desorientar, mas sem dúvida, um grande anjo que me conduziu com tranquilidade, sabedoria e paciência até aqui.

A empresa BioVitro Tecnologia de Embriões LDTA, juntamente com sua equipe entre eles Rossana grande irmã que a vida me deu de presente, à Geussimeire querida amiga e o Sr. Frederico Mendes, pelo apoio e a bela iniciativa de incentivar a pesquisa.

Por fim agradeço a Vida, por me fazer quem eu sou, simplesmente Eu! Feliz por ter a chance de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas que cruzaram meu caminho e que participaram das minhas conquistas, e espero conhecer mais e mais tantas outras, por todas elas terem feito e fazerem toda diferença em minha vida, pelo carinho que recebo de todos e espero retribuir e fazer a diferença na vida destas pessoas de alguma forma. Agradeço por tantas bênçãos!

**MUITO OBRIGADA A TODOS E A TUDO.**

**SARAVA/AXÉ!**

*SOMOS TODOS ANJOS DE UMA ASA SÓ, SE NÃO NOS  
ABRAÇARMOS JAMAIS CHEGAREMOS HÁ ALGUM  
LUGAR!*

*Autor desconhecido.*

## RESUMO

A capacitação espermática é o processo pelo qual espermatozoides alcançam a habilidade fecundante ao percorrer o trato genital feminino, já que espermatozoides de mamíferos não possuem esta capacidade logo após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. Indutores específicos como heparina e cálcio ionóforo são utilizados na indução deste processo fisiológico. Por conseguinte, com o advento das biotecnologias, estudos com a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido empregadas na obtenção de diversas respostas fisiológicas em células somáticas e germinativas. Desta forma, este trabalho verificou a influência da terapia fotodinâmica e da heparina na indução da reação acrossomal bovina *in vitro* e a influência dos agentes indutores (TFD e Heparina) com suas respectivas concentrações sobre a produção *in vitro* de embriões. Foram utilizadas seis doses de sêmen, duas partidas, de um único touro da raça Nelore obtidas na Central de Produção de Sêmen Alta Genetics. Os grupos experimentais foram divididos em dois. Primeiro - Terapia Fotodinâmica (TFD) dispostos em sem tratamento; fotossensibilizador ALA; TFD e TFD + ALA, tendo como tempo de exposição à luz (120 min), potência ( $10 \text{ J/cm}^2$ ), distância de exposição à luz (4,0 cm), concentração de  $120 \mu\text{M}$  do ALA. Segundo – Heparina dispostos em sem tratamento; 0,05  $\mu\text{l}$ ; 0,11  $\mu\text{l}$ ; 0,22  $\mu\text{l}$ ; 0,44  $\mu\text{l}$  de heparina adicionados em 1 ml de meio FIV. As análises do sêmen após os protocolos de TFD e heparina foram feitas por citometria de fluxo (CF), utilizando como marcador da integridade da membrana plasmática o iodeto de propídio (Ip - 1,5 mM) e a taxa de capacitação pela sonda fluorescente de Fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína/*Arachis hypogaea Lectin* (PNA-FITC - 1,125 g/ml). Também foram avaliados após o protocolo de fertilização *in vitro* os índices de índice de clivagem (D3) e conversão embrionária (D7). Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad prism 6.0 cujos dados foram expressos em média e desvio padrão de cinco repetições e os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico one way ANOVA, com pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,0001$ . Analisando os grupos após a terapia fotodinâmica, nos espermatozoides reagidos “capacitados”, verificou-se um número muito baixo de células reagidas sem tratamento (3,7%), quando comparado aos demais tratamentos ALA (27,6%), TFD (39,9%) e ALA+TFD (41,2%). Na avaliação da taxa de clivagem após tratamento com bioestimulador, observou-se significância estatística no grupo sem tratamento (83,8%) quando comparado com os tratamentos ALA (32,3%), TFD (57,3%) e ALA+TFD (42,6%). Na análise de embriões

produzidos em D7, houve significância estatística no grupo sem tratamento (21,6%) quando comparado com ALA (2,2%), TFD (9,0%) e ALA+TFD (1,1%). Na análise dos dados após a indução da capacitação por heparina ocorreu uma tendência maior para capacitação no tratamento com 0,11µl, quando comparado aos demais tratamentos; com valor médio de 4,7% de espermatozoides reagidos. Células que não estavam em presença do tratamento apresentaram valor médio de 0,4%, quando comparados com tratamento por heparina nos volumes de 0,22µl (4,2%), 0,44µl (3,8%) e 0,055µl (2,5%). De acordo com análise da taxa de clivagem pôde-se observar que não houve diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,0001$ ) entre os tratamentos. Na avaliação da porcentagem de embriões produzidos (D7), observou-se significância estatística ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo sem tratamento (44,9%) *versus* o tratamento com 0,11µl de heparina (37,2%) e nenhuma diferença estatística ( $p > 0,0001$ ) entre os demais tratamentos. Estudos apontam que o tempo de estimulação e o potencial de luz, além da dose dos indutores podem aumentar ou deprimir processos fisiológicos que poderiam induzir modificações nas estruturas biológicas, podendo ocasionar uma lipoperoxidação ou aquecimento de proteínas provocando sua desnaturação. A resposta bioquímica da capacitação também descreve resposta fisiológica pela ação de glicosaminoglicanas, uma vez que estes se ligam as proteínas do plasma seminal bovino (BSP). Concluiu-se que o efeito da terapia fotodinâmica causa alterações sobre os processos da capacitação espermática, sendo necessários ajustes na concentração e tempo de exposição à luz. E que a maior concentração de heparina poderia propiciar uma maior interação com as proteínas BSP, e desta forma potencializar capacitação espermática induzida por estas moléculas.

**Palavras Chaves:** Terapia Fotodinâmica, Reação Acrossomal, Produção *in vitro* de Embriões, Heparina.



## ABSTRACT

Sperm capacitation is the process through which sperm cells become able to fecundate an egg, as it goes through the female genital tract. It is needed once mammal sperm cells do not possess this capacity immediately after ejaculation, even though they're mobile and presented with an apparently normal morphology.

Specific inducing drugs, such as heparin and calcium ionophore are used to induce this biological process. Consequently, due to new biotechnologies, photodynamic therapeutic (PDT) studies have been employed to obtain various physiological responses in somatic and germinative cells.

Therefore, this study verified the influence of photodynamic therapy and heparin in the induction of in-vitro bovine acrosome reaction, and the influence of the inducing agents (PDT and Heparin), at their respective concentrations, on in-vitro embryo production.

Six doses of semen by a single nelore bull, including two split ones, which were obtained from the central Alta Genetics semen production facility were used.

The experimental groups were divided into two. First - Photodynamic therapy (PDT) samples were arranged as: Not treated; ALA photosensitizer; PDT; and PDT + ALA, while being exposed to light for 120 minutes, at 10 J/cm<sup>2</sup>, placed 4 cm from the light source, and receiving 120µM ALA concentration.

The second group (Heparin) was arranged as: Not treated; 0.05µl; 0.11µl; 0.22µl and 0.44µl of heparine added to 1ml of a FIV medium.

The analyses of the semen after the PDT and heparin protocols were done by flow cytometry (FC), utilizing propidium iodide (PI - 1,5nM) as a marker for the integrity of the plasmatic membrane. A Fluorophore fluorescent substance, fluorescein isothiocyanate (PNA-FITC - 1.125g/ml) was used to indicate the rate of capacitation.

The cleavage index(d3) as well as embryonic conversion(d7) were also evaluated after the in-vitro fertilisation protocol. In order to perform statistical analyses, the software graphpad prism 6.0 was used, which displayed the data in arithmetic mean and 5 repetition standard deviation.

The treatments were analysed by a parametric one-way ANOVA test, followed by a Bonferroni post-test. The differences were considered statistically significative when  $p < 0.0001$ .

Post Photodynamic therapy analysis showed that a very small number of non-treated cells were considered capacitated (3.7%), whereas the samples treated with ALA, PDT and ALA+PDT presented higher capacitation rates at 27.6%, 39.9% and 41.2% respectively.

Post bio-stimulation treatment cleavage rate analysis showed statistical significance within the non-treatment group (83.8%) when compared to ALA (32.3%), PDT (57.3%) and ALA+PDT (42.6%).

D7 Embryo production Analysis showed statistical significance within the non-treated group (21,6%),when comparing to ALA (2.2%), PDT (9.0%) and ALA+PDT(1.1%). When analysing the data of post induction capacitation by heparin, there was a higher capacitation rate within the 0.11µl group, when compared to the other treatments; with an average value of 4.7% reacting sperm cells. The cells which were not treated had a capacitation rate of 0.4%, while the 0.22µl,0.44µl and 0.05µl treatments had 4.2%, 3.8% and 2.5% respectively.

According to the cleavage rate analysis, one could observe that there was no important statistical discrepancy ( $p>0.0001$ ) among the different treatments. In the produced embryo percentage evaluation(D7), one could observe an statistical significance ( $p<0.0001$ ) between the non-treated group (44.9%) versus the 0.11ul heparin treatment(37.2%) and no statistical difference between the remaining treatments.

Studies show that the stimulation exposure length and the light potency, as well as the inducing drug dosage can enhance or diminish physiological processes that could induce biological structure modifications, which could lead to lypoperoxidation or heating of proteins, thus leading to denaturation.

The capacitation biochemical response also describes a physiological response through glycosaminoglycan action, once those bind to the bovine seminal plasmatic proteins.

It can be concluded that the effect of photodynamic therapies cause changes within the sperm capacitation processes, although further concentration and exposure length could be adjusted, Also, a higher heparin concentration could allow for a higher interaction with BSP proteins, and thus potencialize the spermatic capacitation induced by those molecules.

**Key Words:** Photodynamic Therapy; acrosomal reaction; *in vitro* embryo production; heparin;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Fluxograma experimento I e II.....30
- Figura 2 Análise experimental dos testes de capacitação indutor (ALA), terapia fotodinâmica. (TFD) e indutor mais terapia fotodinâmica (ALA+TFD): (IP negativo/PNA positivo) Porcentagem de células que sofreram capacitação sem lesão na membrana plasmática. Significância estatística (  $p < 0,0001$ ).....38
- Figura 3 Análise experimental dos testes de fertilização in vitro utilizando indutor (ALA), terapia fotodinâmica. (TFD) e indutor mais terapia fotodinâmica (ALA+TFD): **a**) porcentagem da taxa de clivagem (D3); **b**) porcentagem de embrião em D7; (\*) baixa significância estatística; (\*\*) média significância estatística; (\*\*\*) alta significância estatística (\*\*\*\*) Extremamente significativo. Considerar diferença estatística (  $p < 0,0001$ ).....39
- Figura 4 Análise experimental dos testes de capacitação utilizando diferentes concentrações de Heparina. Porcentagem de células que sofreram capacitação sem lesão na membrana plasmática. Significância estatística (  $p < 0,0001$ ).....50
- Figura 5 Análise experimental dos testes de fertilização in vitro de utilizando diferentes concentrações de Heparina. **a**) porcentagem da taxa de clivagem (D3); **b**) porcentagem de embrião em D7; (\*) Significância, (  $p < 0,0001$ ).....50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias e desvios padrão nas análises de espermatozoides bovinos, pós - congelamento por citometria de fluxo, TFD.....	37
Tabela 1	Médias e desvios padrão nas análises de espermatozoides bovinos, pós- congelamento por citometria de fluxo, após o tratamento com heparina.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

I	Um
II	Dois
XIX	Dezenove
x	Vezes
%	Porcentagem
	Maior ou Igual
μl	Microlitros
°C	Graus Celsius
μm	Micrometro
a.c	Antes de Cristo
AC	Adenilciclase
ALA	Ácido 5 aminolevulínico
AMPc	Adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
BSP	Proteína Ligadora ao Espermatozoide
CCO	Complexo Cumulus Oophorus
CF	Citometria de fluxo
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
Cm	Centímetros
Cm <sup>2</sup>	Centímetro Quadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
D3	Dia 3
D7	Dia 7
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ERO <sub>2</sub>	Espécies Reativas do Oxigênio
FICT	Fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FLA1	Fotodetector 1
FLA3	Fotodetector 3

FS	Fotossensibilizador
GAGs	Glicosaminoglicano
GABA	Ácido gama aminobutírico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IP	Iodeto de Propídio
J	Joules
mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MP	Membrana Plasmática
MW	Megawatt
Na <sup>+</sup>	Sódio
Cl <sub>2</sub>	Cloro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NO <sub>3</sub>	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sup>2-</sup>	Ânio Superóxido
<sup>o</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , <sup>o</sup> OH	Radicais Livres
PBS	Solução Salina Fosfatada
PDT	Photodynamic Therapy
pH	Potencial Hidrogênico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína Kinase
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
PNA	Arachis hypogaea Lectin
PpIX	Precursor de Protoporfirina IX
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotação por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SOF	Synthetic Oviduct Fluid

SPTZ	Espermatozóide
TCM	Tissue Culture Medium
TFD	Terapia Fotodinâmica
USP	unidade de atividade enzimática determinada segundo a United States Pharmacopeia
ZP	Zona Pelúcida

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<b>TERAPIA FOTODINÂMICA</b> .....	16
2.1.1	<b>Histórico</b> .....	16
2.1.2	<b>Terapia Fotodinâmica</b> .....	17
2.1.3	<b>Aplicabilidade da Terapia Fotodinâmica</b> .....	18
2.1.4	<b>Mecanismo de Ação</b> .....	19
2.1.5	<b>Fotossensibilizadores (FS)</b> .....	20
2.2	<b>ESTRUTURAS ESPERMÁTICAS</b> .....	21
2.3	<b>CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA</b> .....	22
2.4	<b>INDUTORES DE CAPACITAÇÃO</b> .....	25
2.5	<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	25
2.5.1	<b>Citometria de Fluxo</b> .....	26
2.5.2	<b>Sondas Fluorescentes</b> .....	26
2.5.2.1	<b>Aglutininas Combinadas ao Isotiocianato de Fluoresceína/Arachis hypogae Aglutina/Iodeto de Propídio (FITC-PNA/ID)</b> .....	27
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	29
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
4	<b>FLUXOGRAMA EXPERIMENTOS I E II</b> .....	30
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS I</b> .....	31
5.1	<b>EXPERIMENTO I- TERAPIA FOTODINÂMICA</b> .....	31
5.1.1	<b>Preparação Espermática</b> .....	31
5.1.2	<b>Protocolo Terapia Fotodinâmica</b> .....	31
5.1.3	<b>Procedimento de Marcação com sondas Fluorescentes</b> .....	32
5.2	<b>PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES</b> .....	32
5.2.1	<b>Coleta, recuperação e seleção oocitária</b> .....	32
5.2.2	<b>Maturação <i>in vitro</i> (MIV)</b> .....	33
5.2.3	<b>Preparação do Sêmen</b> .....	33
5.2.4.1	<b>Delineamento Experimento I- Produção <i>in vitro</i> de Embriões na TFD</b> .....	34
5.2.5	<b>Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)</b> .....	35



5.3	ESTATÍSTICA .....	36
6	<b>RESULTADOS</b> .....	37
6.1	EXPERIMENTO I - TERAPIA FOTODINÂMICA .....	37
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
7.1	EXPERIMENTO I - TERAPIA FOTODINÂMICA .....	40
8	<b>MATERIAL E METODOS II</b> .....	42
8.1	EXPERIMENTO II - HEPARINA .....	42
8.1.1	<b>Preparação Espermática</b> .....	42
8.1.2	<b>Protocolo Heparina</b> .....	42
8.1.3	<b>Procedimentos de Marcação com Sondas Fluorescentes</b> .....	43
8.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES .....	44
8.2.1	<b>Coleta, recuperação e seleção oocitária</b> .....	44
8.2.2	<b>Maturação <i>in vitro</i> (MIV)</b> .....	44
8.2.3	<b>Preparação do Sêmen</b> .....	45
8.2.3.1	<b>Delineamento experimento II- Produção <i>in vitro</i> de Embriões</b> .....	45
8.2.4	<b>Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)</b> .....	46
8.3	ESTATÍSTICA .....	47
9	<b>RESULTADOS</b> .....	48
9.1	EXPERIMENTO II - HEPARINA .....	48
10	<b>DISCUSSÃO</b> .....	52
10.1	EXPERIMENTO II - HEPARINA .....	52
11	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
11.1	EXPERIMENTO I – TERAPIA FOTODINÂMICA .....	55
11.2	EXPERIMENTO II – HEPARINA .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
	<b>ANEXO I: Ofício CEEA–069/2014</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da crescente evolução nas pesquisas na área de biotecnologia da reprodução, em específico na produção *in vitro* de embriões (PIVE) de bovinos, observa-se ainda uma grande necessidade de novas pesquisas, para que se consiga estabelecer protocolos que atinjam resultados na taxa de conversão embrionária superior aos que existem atualmente. Fatores intrínsecos aos protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) podem interferir negativamente em todas as etapas da PIVE, tendo por consequência uma baixa conversão embrionária. Destes destacamos a maturação oocitária, fertilização e o cultivo. Apesar de muitas pesquisas destinadas a eficiência e melhoramento da técnica de PIVE, ainda não foi preconizado um protocolo de produção capaz de fechar estas arestas no sentido de aumentar a conversão embrionária e de baixar os custos desta técnica.

Há muitos relatos descritos evidenciando fatores inerentes a qualidade oocitária dos diferentes sistemas de co-cultivo, meios de cultivo, e diferentes atmosferas gasosas, que afetam as taxas de conversão embrionária oriundas da PIVE (KHURANA, NIEMANN, 2000).

Para que se produza um embrião de PIVE, tem que se cumprir algumas etapas, entre elas destaca-se a aspiração ou coleta dos oócitos em doadoras no campo e no laboratório, a maturação, fecundação e cultivo (GONÇALVES, 2007). Perante estas etapas, não se deve descartar a influência paterna expressa na fase pré-implantacional, pois as células espermáticas apresentam fatores importantes para a ativação dos oócitos (TESARIK et al., 2004).

Segundo Erenpreiss et al., 2006, a célula espermática é responsável por carrear o material genético haploide e os fatores citoplasmáticos que são necessários para o desenvolvimento embrionário adequado, pois se ocorrer alguma injúria nesta célula as taxas de desenvolvimento embrionário podem ser reduzidas.

Na busca de melhor compreender a influência do espermatozoide no procedimento de PIVE, Tesarik (2005), constataram em seus estudos que essa influência pode agir negativamente, tendo por consequência um desenvolvimento embrionário moroso, quando as células espermáticas apresentam prejuízo no DNA ou alterações na organização de sua cromatina.

Este trabalho se reveste de especial relevância, tanto teórica quanto prática, pelo aspecto inovador de utilização da técnica de TFD como princípio de indução das respostas

bioquímicas da capacitação em espermatozoides e, conseqüente, reação acrossomal de bovino. A literatura registra estudos com a Terapia Fotodinâmica em indução de células somáticas. Assim, este trabalho busca ampliar a utilização da biotecnológica para possibilitar novas ferramentas para a FIV. Por outro lado, neste trabalho observa – se um avanço com a possibilidade de estudo nos mecanismos relacionados a capacitação espermática e reação acrossomal em bovinos. Embora não sejam investigados os mecanismos da TFD, este estudo promove a abertura de outra linha de investigação.

Neste estudo a questão a que se coloca é avaliação dos efeitos da TFD sobre a capacitação espermática e reação acrossomal, e verificar a possível melhoria na taxa de conversão embrionária PIVE.

Como se pode observar o tema deste estudo é bastante amplo e não considera – se que tenham sido esgotadas todas as variáveis envolvidas no processo de reprodução *in vitro* e de sua melhoria nesta investigação. Na delimitação do problema, o pesquisador se defronta com fatores que estabelecem limites para a determinação do seu projeto, e neste caso foram realizados alguns recortes que circunscrevem o âmbito deste estudo. Apesar da existência de múltiplos protocolos e meios de maturação, fertilização e cultivo, optou - se pelo protocolo estabelecido pela empresa Biovitro Tecnologia de Embriões LTDA. Uma vez que foge ao objetivo o estudo dos protocolos de PIVE. Considera-se que dado ao caráter deste trabalho como iniciador de uma linha de pesquisa, tais limitações não prejudicam o alcance dos objetivos.

A hipótese é de que com a utilização da terapia fotodinâmica em conjunto com protocolos de FIV seria um procedimento eficiente para otimizar a utilização do sêmen de em animais produzidos na FIV.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

#### 2.1.1 Histórico

Embora a TFD ainda seja nova, há relatos de sua utilização extremamente antiga, em 1.400 a.c. na Índia, onde foi observado os efeitos da luz em tratamento de Vitiligo, utilizando as sementes de plantas, que associadas a luz solar promoviam de alguma forma a melhora de indivíduos acometidos por essa enfermidade. E nesse mesmo período, Egípcios antigos, relataram o uso desta técnica no tratamento de leucodermias (PENEG et al, 1996; LUCRAY, 2002).

Porém, segundo Lucray (2002), o primeiro relato cientificamente descrito, da ação da TFD foi no século XIX, ao observarem a toxicidade de um alcalóide (Quinina) pela luz, sobre ovos de sapo e sobre as plantas.

A partir do século XX, a TFD começou despontar com potencial científico através de observações feitas pelos pesquisadores Oscar Zaab e Herman e Van Tappeiner na Alemanha. Estes inferiram que havia conexão entre a ativação de corantes pela luz e o resultado terapêutico. Neste estudo eles descobriram que a iluminação de culturas microbianas na presença de Acridina (composto orgânico e heterocíclico) e derivados, resultaram na morte celular (BABILAS et al., 2005; ALLISON et al., 2004; KESSEL, 2004; LUCRAY, 2002).

Em 1978, o pesquisador Thomas Douglerty, promoveu o primeiro estudo clínico com derivado de hematoporfirina (HpD), onde foram avaliados 25 pacientes e 113 lesões malignas de pele. Sendo que 87% dos pacientes tratados obtiveram resposta completa e 13% dos pacientes tratados obtiveram resposta parcial ao tratamento.

Contudo os efeitos benéficos da TFD pela luz laser têm sido utilizados e aplicados há mais de sessenta e três anos. Preferencialmente, na área médica com os objetivos de diagnóstico, terapia e pesquisa (SVAASAND, 1991).

A oftalmologia e a dermatologia as áreas que implantaram essa tecnologia com maior intensidade, verificando-se resultados expressivos, garantido ser uma técnica de real potencial (TORRICELLI et al., 2001).

### 2.1.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica TFD ou PDT ( *do inglês Photodynamic Therapy*) é uma técnica que se define como uma reação fotoquímica utilizada que pode causar destruição seletiva de um tecido. Sendo esta técnica terapêutica dividida em duas etapas, onde se utiliza uma droga sensibilizante, tópica ou sistêmica, que é acompanhada pela irradiação de uma luz visível. Os fotossensibilizantes (drogas sensibilizantes) são administrados exogenamente ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio para induzir morte celular (KURWA, 1999; KALKA et al., 2000).

O uso da bioestimulação em tecidos pela irradiação a laser apresenta-se como uma opção viável devido seus efeitos positivos (NAVRATIL, DYLEVSKY, 1996), já que este atua em tratamentos sobre diferentes tecidos biológicos de diversas formas, com ação trófico-regenerativa, antiinflamatória e analgésica (OZDEMIR et al, 2001), os quais vem sendo mostrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. A ação bioestimulatória da TFD é bastante significativa, depende da potência utilizada e, principalmente, de características como a monocromaticidade, direcionalidade e coerência de sua luz (KUBOTA et al., 1989).

Dependendo do estado fisiológico e o tecido que integra, cada célula determina um limiar de sobrevivência, que pode atuar de acordo com a energia em que é exposta, se está for de baixa intensidade, a sua biorregulação será induzida, já que o modelo biológico utilizará essa energia buscando manter ou normalizar suas funções, por meio da estimulação de membranas e organelas (ALMEIDA, 1999).

Outro efeito da luz pode ser fotoquímico ou fotofísico, visíveis ou não. Quando a luz incide em culturas de monocamadas de células *in vitro* conserva - se a polaridade, e a coerência dando precisão aos resultados biológicos; este efeito é chamado de fotoquímico (FENNYO, 1984; OULARAMARA, 1989; PONTINEN, 1992). Segundo os pesquisadores Coll (1987) e Passarella et al., (1984), o efeito fotofísico relaciona-se aos processos que provocam alterações dos potenciais elétricos de membrana ampliando a síntese de ATP.

Estudos indicam que as irradiações a laser podem favorecer o aumento de ATP mitocondrial (PASSARELLA et al., 1984), ordenando um grande número de reações, como participação no metabolismo celular, aumentando a síntese de DNA e RNA, tanto nas células eucariontes quanto nas procariontes (KARU, 1985a; KARU, 1985b; MASTER, 1983).

Nos efeitos visíveis a absorção de fótons por bioestimulação intracelulares específicos produzem estímulos ou inibição de atividades enzimáticas, como também de reações fotoquímicas, portanto estas definem mudanças ou processos fotodinâmicos em cadeias complexas, em moléculas básicas, que atuam nos processos fisiológicos com conotações terapêuticas (FENNYO, 1984; OULARAMARA, 1989; PONTINEN, 1992).

Biologicamente os efeitos da irradiação dependem do comprimento de onda, potência, tempo de exposição e dose de irradiação ou fluência (HARRIS, 1988; KARU, 1988).

As baixas dosagens induzem estímulos, e as altas dosagens deprimem processos fisiológicos, portanto os extremos causam destruição das estruturas biológicas, podendo ocasionar uma lipoperoxidação ou aquecimento de proteínas provocando sua desnaturação (GIROTTI, 2001; KARU, 1994, KARU, 1998).

Cada célula apresenta um limiar próprio de sobrevivência conforme o seu estado fisiológico e o tipo de tecido, que é modulado de acordo com a energia fornecida (ALMEIDA, 1999).

O aumento de fatores de crescimento no meio de cultura das células irradiadas é ocasionado pelo efeito da bioestimulação a partir da proliferação celular (RICCI, 2003).

Pode - se com a bioestimulação emitida pela TFD, tentar mimetizar os padrões na expressão de RNAm que ocorre *in vivo*, já que a irradiação à laser interfere nos níveis dos nucleotídeos cíclicos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA (KARU, 1998).

### **2.1.3 Aplicabilidade da Terapia Fotodinâmica**

A TFD tem aplicabilidade em tratamentos de diversas patologias, entre elas destaca – se a oncologia, controle microbiológico bucal, infecção parasitária, fungicas e bacterianas, e em alguns vírus como o *Herpes Simplex Vírus* (BAGNATO, 2008). O uso desta fototerapia também tem sido empregada em tratamentos estéticos de rejuvenescimento (KOHL, KARREL, 2011).

Em estudos feitos pelos pesquisadores Peplow et al., (2010), com a TFD utilizando a luz laser de baixa potência para avaliar a viabilidade e proliferação de células cultivadas *in vitro*, e tanto de humano quanto de animais. Foram consideradas as células troncos, endoteliais, da musculatura lisa, queratinócitos, monócitos e fibroblastos, avaliando a quantidade de células, viabilidade celular, dano de DNA, a integridade de membrana, síntese

e liberação de proteínas, morfologia celular, organela celular e características ultraestruturais. Neste estudo foi sugerido que a TFD com uso de luz laser de baixa potência promoveu a proliferação celular em número de células, viabilidade celular, integridade de membrana e dano de DNA, além de proporcionar a diferenciação de células – tronco em tipos de células especiais.

A utilização da TFD de luz laser de baixa potencia demonstra que possui a habilidade de modular a proliferação celular, seja variando a frequência ou a amplitude de ondas eletromagnéticas, promovendo principalmente estimulação celular. Em relação aos mecanismos moleculares relacionados, essa ferramenta (TFD) detém um papel importante na ativação da cadeia respiratória da mitocôndria e no início da sinalização celular, pois pode induzir a fosforização do receptor da proteína tirosina quinase. Ao avaliar os efeitos diretos da TFD através da luz laser de baixa potência, estes perduraram até 3 horas após a irradiação, já os efeitos indiretos com proliferação e expressão de proteína, por um período maior que 24 horas (PEPLOW et al., 2010).

Em sêmen bovino a reação das células espermáticas submetidas à irradiação laser com comprimento de onda de 360, 630, 660 e 830 nm, promove a estimulação da produção de radicais livres hidroxilas (LUBART et al., 2000).

Estudos elaborados por Lavi et al. (2011), observaram que ao expor células espermáticas isoladas a irradiação com comprimento de onda de 400 a 800nm e potência de 40 ou 130 mW/cm<sup>2</sup>, induziu a proliferação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

#### **2.1.4 Mecanismo de Ação**

A luz laser usada em fototerapias, promove uma estimulação de elétrons de uma substância radioativa, por meio da geração de descarga de energia elétrica, e em um nível mais elevado de energia. Como essa reação é instável, os elétrons voltam a sua órbita de origem, porém ao retornarem são acometidos por fenômenos como emissão espontânea, que é a liberação da energia excedente em forma de fóton (partícula elementar de força eletromagnética) (BAXTER, 1997; BAGNATO, 2001).

Segundo Velez e Coll (1988) a eficiência da terapia dos lasers de baixa potência depende de uma reação em cadeia iniciada pelo fóton, como indutor da resposta biológica sobre as vias metabólicas.

Quando ocorre a absorção dos fótons gerados pela radiação, acontece um efeito de excitação das moléculas, por mudança do potencial redox, agindo na regulação e cinética da respectiva via bioquímica. Com esta alteração que é focal, inicia-se uma série de alterações bioquímicas em cadeias favorecendo a mudança das funções metabólicas e proliferativas das células (KARU, 1998).

Segundo Rocha Júnior et al., (2007), para que a luz laser tenha potência e propriedades terapêuticas, vai depender do comprimento de onda; quanto menor o comprimento de onda, maior a ação e o poder de penetração da luz.

### **2.1.5 Fotossensibilizadores (FS)**

Na TFD para que estes processos ocorram, dependerá da retenção de um fármaco fotossensibilizador exógeno nos tecidos alvo e, posteriormente, a irradiação com luz visível em comprimento de onda adequado. Quando ocorre a ativação, o fármaco pode gerar, por exemplo, oxigênio Singlete ( $O_2$ ), radicais livres ( $^{\circ}O_2$ ,  $^{\circ}OH$ ) e ondas especiais reativas de  $O_2$  ( $ERO_S$ ), responsáveis pelo processo de bioestimulação, dependendo da intensidade de luz fornecida (PERUSSI et al., 2007).

Existem diversos fármacos fotossensibilizante utilizados na TFD, mas na prática, fotossensibilizadores (FS) mais utilizados são os derivados do núcleo aromático tetrapirrólico presente em vários pigmentos naturais (CASTANO et al., 2004).

Segundo Dougherty et al., (1998), os FS são classificados de acordo com suas estruturas químicas, podendo pertencer à várias famílias como as da porfirinas e das clorofilas.

Os FS são caracterizados por gerações, como as de 1ª geração, 2ª geração e 3ª geração. Os de 1ª geração são os derivados de hematoporfirinas (éster/éster de dihematoporfirina), os de 2ª geração são os ftalocianinos, clorinas e bacterioclorinas, os quais apresentam melhorias nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em relação à 1ª geração, e a 3ª geração que são os compostos fotossensíveis de 2ª geração modificados (sintéticos) (BONNETT, 1995).

Para o uso de FS em TFD têm que se considerar algumas propriedades importantes para o seu uso, as quais devem oferecer baixa toxicidade, seletividade pela célula alvo, serem eliminados do corpo em um período de tempo curto e serem ativados em comprimentos de



onda adequados para penetrar no tecido (ALLISON et al., 2004; CASTANO et al., 2004; LUCRAY et al., 2000; DOUGHERTY et al., 1998).

O fotossensibilizador ácido 5 – aminolevulinico (ALA) de molécula hidrofílica de baixo peso molecular, são capitados pelas células, principalmente através do transporte ativo, como  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , dependente de beta aminoácidos como glicina e ácido gama aminobutírico (GABA) (CALZAVARA et al., 2009).

O AIA é um pró fármaco potente no uso da TFD, pois em seu uso tópico estimula a formação *in situ* de PpIX (precursor de protoporfirina IX) (FUKUDA et al., 2005). Sendo o PpIX um eficaz FS que também contem precursor de grupo heme que são importantes para o metabolismo de energia (CASTANO et al., 2004; STELL et al., 2001; KENNEDY et al., 1990;). Na TFD, ao utilizar o ALA tópico, demonstrou uma eficiência expressiva em uma série de doenças cutâneas como Carcinoma de Células Basais superficiais, Queratose Actinica, doença de Bowem, Carcinoma Espirocelular, Verrugas, Papilomas e micoses fungoides (BABILAS et al., 2005).

O FS ALA é um composto de 2ª geração, que se destaca, pois geram oxigênio Singlete e possui elevado coeficiente de absorção na faixa de 600 – 800 nm, sendo este comprimento de onde eficiente ao proporcionar a penetração da luz no tecido, sem interferência de cromóforos endógenos do próprio sistema biológico (WILSON, 1989).

## 2.2 ESTRUTURAS ESPERMÁTICAS

O espermatozoide é uma célula composta por uma cabeça, uma cauda unida pelo colo e uma membrana plasmática que cobre toda a célula (MORTIMER et al., 1997 EDDY, O'BRIEN, 1994); são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos apresentando-se como células alongadas (GARNER, HAFEZ, 1995).

É uma célula complexa que se torna infértil quando um de seus fatores bioquímicos ou morfológicos são afetados, sendo que a combinação entre todos estes são necessários para sua integridade (MELO, HENRY, 1999).

O espermatozoide é coberto por toda a sua extensão pela membrana plasmática, promovendo os limites entre o citosol e o ambiente extracelular (ALBERTS et al., 2004; AMANN, GRAHAM, 1992).

As membranas das células espermáticas são contidas de proteínas (integrals e periféricas), e estão interpostas por fosfolípidios (HAFEZ, 1995; AMANN, PICKETT, 1987). Essas proteínas exercem a maioria das funções específicas da membrana (ALBERTS et al., 2004). Entre estas funções destacam-se as proteínas envolvidas com enzimas do acrossomo, receptores da membrana plasmática, os rudimentos ligados a funcionalidade da membrana (transporte de íons e carboidratos) e estruturas do citoesqueleto como forma da cabeça e provendo os filamentos da cauda (AMANN, GRANHAM, 1992).

O acrossomo é uma estrutura oriunda do Complexo de Golgi e tem sua formação na espermiogênese. Esta estrutura possui enzimas hidrolíticas que participam do processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (HAFEZ, 1995; EDDY; O'BRIEN, 1994). É composto por duas membranas sendo uma interna e outra externa, e o conteúdo acrossômico. No evento da reação acrossômica, a membrana externa e a membrana plasmática se fundem formando vesículas que posteriormente liberaram o conteúdo acrossomal contido nesta, e a membrana interna e o segmento equatorial perduram até a fusão do espermatozoide com o oócito (FLESCHE, GADELLA, 2000).

### 2.3 CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA

Durante a capacitação, acontecem modificações alterando a distribuição de proteínas na superfície da célula espermática, mudanças na membrana plasmática, alterações nas atividades enzimáticas e modulação na expressão de componentes intracelulares (YANAGIMACHI, 1994), resultando no gameta masculino capaz de penetrar as barreiras oocitárias e responder aos estímulos que induzem a reação acrossomal, envolvendo modificações nos níveis de cálcio intracelular e mudanças na fosforilação proteica (PARRISH et al., 1999).

Os espermatozoides são maturados no epidídimo e após sua maturação são capazes de se mover efetivamente, porém, são incapazes de fecundar o oócito, a menos que as células espermáticas sofram modificações no trato reprodutivo feminino (BEDFORD, et al., 2003; GADELLA, COLENBRANDER, 2003). Sendo esse conjunto de modificações, denominado de capacitação espermática (SENGER, 2003; BAZER et al., 1995; DELPECH, THIBAUT, 1993).

As grandes alterações que acomete as células espermáticas ocorrem nos constituintes da membrana espermática, as quais podem ser modificadas ou removidas por secreções do trato genital feminino, desencadeando a desestabilização da bicamada lipídica. Após a desestabilização a membrana plasmática se fundi à membrana acrossômica externa, dando início a reação acrossômica (BAZER et al., 1995; DELPECH, THIBAUT, 1993; AMANN, GRAHAM, 1992), a partir do início da reação acrossomal, irá acontecer mudanças na motilidade espermática, tendo por consequência a hiperativação do espermatozoide (DELPECH, THIBAUT, 2003; AMANN, GRAHAM, 1992).

As proteínas do plasma seminal seguem entremeadas aos espermatozoides, e estas proteínas se aderem à membrana espermática, formando uma capa de glicoproteínas. Esse processo é denominado de decapacitação espermática. “*In vivo*”, o espermatozoide passa do plasma seminal para os fluidos do trato feminino, sem que ocorra a capacitação precoce do espermatozoide (SENGER, 2003; DELPECH, THIBAUT, 1993).

Quando os espermatozoides chegam ao útero, a capa glicoproteica é removida ou modificada (GADELLA et al., 2001). Ocorrendo alteração no fluxo iônico, que por sua vez estimula mecanismos de transporte transmembrana, promovendo repostas bioquímicas e fisiológicas nas células espermáticas.

Segundo Manjunath et al., (2002) há ação de proteínas do plasma seminal no processo de capacitação, em especial as BSP (Proteínas Ligadoras ao Espermatozoide). Estas proteínas possuem afinidade com fosfolipídios-colina, que tem ação direta na retirada de colesterol da membrana, favorecendo a saída de fosfolipídios no início da capacitação em espermatozoides bovinos, o que é reforçado pela ação conjunta de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Heparina e albumina sérica bovina (BSA) favorece a alteração da fluidez e permeabilidade da membrana plasmática durante a capacitação (MANJUNATH, THÉRIEN, 2002; CROSS, 1998).

Gwathmey et al., (2006), observaram que *in vitro* as BSP`s estão relacionadas com a motilidade contínua do espermatozoide durante a fase de armazenamento na tuba uterina.

Segundo estudos feitos por Cuneo et al., (2004) a heparina presente no muco uterino pode induzir a capacitação espermática através de proteínas ligadoras de heparina. Este glicosaminoglicano liga se à membrana plasmática (MP) do espermatozoide, tendo como consequência a potencialização de seus efeitos, pois multiplicam os locais de atuação na membrana plasmática.

A heparina é um glicosaminoglicano, que tem como função estimular o aumento da concentração de cálcio intracelular, do pH e das concentrações de cAMP, que parecem ser necessárias para iniciar a capacitação (CORMIER, BAILEY, 2003).

As proteínas do plasma seminal são absorvidas pela membrana plasmática do espermatozoide, e a heparina promove a capacitação pela ligação a estas proteínas e remoção das proteínas que inibem a capacitação (MANJUNATH et al., 2002).

Os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres em condições aeróbicas (BAUMBER et al., 2003; BALL, VO, 2002), a maioria desses radicais livres são oriundos de atividade metabólica normal (LAMIRANDE et al., 1997).

Lamirande et al., (1997), inferiram com seus estudos que os radicais livres, como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico ( $NO_3$ ), induzem hiperativação, capacitação e reação acrossômica “*in vitro*”.

O bicarbonato atua na cauda espermática levando a fosforilação da tirosina, induzindo a hiperativação (GADELLA, COLENBRANDER, 2003). E esta reação leva ao aumento da amplitude do batimento flagelar, principalmente na peça intermediária, devido a sua maior flexibilidade, e mudança do movimento progressivo que se torna circular, provavelmente pelo fato da não rotação da cabeça do espermatozoide (DELPECH; THIBAUT, 1993). O bicarbonato proporciona a desorganização da membrana (COLENBRANDER, 2002; GADELLA et al., 2001), principalmente na região apical da cabeça do espermatozoide (GADELLA; COLENBRANDER, 2003). Portanto foi sugerido que a capacitação das células espermáticas dos mamíferos “*in vivo*” também fosse dependente de bicarbonato (FLESCHE; GADELLA, 2000; COLENBRANDER, 2002; GADELLA, COLENBRANDER, 2003).

Para que ocorra a capacitação, o acrossoma necessita passar por modificações para e posterior reação acrossômica (GADELLA, COLENBRANDER, 2003; COLENBRANDER, 2002; GADELLA et al., 2001; BAZER et al., 1995; AMANN, GRAHAM, 1992).

A reação acrossômica, só ocorre após as etapas da capacitação espermática se concluírem e com isso o espermatozoide se torna apto a fecundação a atingir o local de penetração do oócito, na ampola da tuba uterina (BAZER et al., 1995).

As proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida expostas à zona pelúcida (ZP), se ligam a estas, proporcionando a agregação e a fosforilação da tirosina. O ambiente das proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida possuem grandes concentrações de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Portanto as proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. O pH intracelular aumenta através da proteína G e o potencial de membrana

despolariza. O aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, acarretam em maiores concentrações de cálcio intracelular, ativando a translocação da fosfolipase C (PLC) para a membrana plasmática durante a capacitação. O aumento do cálcio intracelular ativa a fosfolipase A (PLA) que lisa os fosfolipídios em ácidos graxos livres e, conseqüentemente, estimulam a proteína kinase C (PKC). Todas essas alterações são importantes para a fusão da membrana plasmática à membrana acrossômica externa, e assim proporcionando a reação acrossômica e secreção de enzimas acrossômicas (FLESCH, GADELLA, 2000).

## 2.4 INDUTORES DE CAPACITAÇÃO

A capacitação espermática é um processo que envolve muitas fases, sendo que estas não são totalmente compreendidas. Ocorrem mudanças bioquímicas e estruturais na membrana plasmática dos espermatozoides, sendo que estas mudanças afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana espermática.

Para que ocorra esta capacitação *in vitro*, adicionam-se agentes capacitores como a heparina e o cálcio ionóforo (YANG et al., 1993). Para Ax e Lenz (1986) os espermatozoides bovinos com fertilidade têm maior taxa de reação acrossômica em resposta às substâncias semelhantes à heparina, pois os seus espermatozoides possuem maior afinidade aos glicosaminoglicanos (GAGs) em comparação aos touros com baixa fertilidade.

Alguns pesquisadores observaram que a heparina induz a capacitação espermática, sendo sua ação notada no início do processo de incubação, porém deve ser no mínimo de 4 horas (PARRISH et al., 1986).

Alguns estudos foram feitos por Fukui, Mochizuki e Sonoyama (1990) e Parrish et al., (1986), que ao utilizarem heparina em diferentes doses e tempos de incubação, observaram aumento da taxa de fecundação nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/ml e diminuição a 200 mg/ml, Parrish et al., (1986) e Fukui et al., (1990), em seus estudos afirmam que a heparina é o glicosaminoglicano mais potente para capacitar espermatozoides bovinos.

## 2.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Neste capítulo abordamos a utilidade da técnica de citometria de fluxo, bem como a utilização das sondas fluorescentes.

### 2.5.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que possibilita diminuir a subjetividade e aumenta o grau de repetição nas análises de sêmen. Por ser um método rápido e objetivo permite a determinação simultânea de múltiplas características celulares, principalmente em células isoladas em suspensão, como: antígenos de membrana citoplasmáticos e nucleares e conteúdo de ácidos nucléicos. Quando as células a serem estudadas se acoplam a um fluorocromo, que reconhece um ponto ligante desta célula. Desta forma, as amostras são injetadas em um sistema de fluídos para ser exposta individualmente a um feixe de luz focalizada (laser), que ao chocar nas células marcadas se desvia, esta mudança de direção é registrada por detectores especiais (GRAHAM, 2001; GRAHAM et al., 1990).

Uma série de características morfofuncionais das células espermática pode ser analisada como integridade das membranas plasmática e acrossomal (GILLIAN et al., 2005).

Na avaliação do sêmen por citometria são usadas sondas fluorescentes que prescrevem maior contraste e menor variabilidade do que as colorações clássicas (GARNER, JOHNSON, 1995). O iodeto de propídio (IP) capaz de avaliar a integridade da membrana plasmática é um corante de destaque, pois é de fácil e rápido uso. É excitado em comprimentos de onda de 490 nm (GILLIAN et al., 2005). A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser estudada com o uso do PNA (*Arachishypogaea*), uma lectina capaz de se ligar especificamente com compostos da membrana acrossomal sendo eles carboidratos de glicoproteínas. Ela é conjugada a um fluorocromo verde o FITC (isoticianato de fluoresceína), comprimento de onda 550 nm.

### 2.5.2 Sondas fluorescentes

O uso das técnicas de coloração por fluorocromos facilitou a avaliação do sêmen pós-descongelamento. As sondas fluorescentes isoladas ou combinadas, permitem a verificação da

integridade das membranas e podem ser visualizados concomitantes ou separadamente, usando diferentes filtros (GILLAN et al., 2005; JANUSKAUSKAS, ZILINSKAS, 2002; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

### **2.5.2.1 Aglutininas Combinadas ao Isotiocianato de Fluoresceína/ *Arachis hypogaea* - Aglutinina/Iodeto de Propídio (FITC-PNA/IP)**

De acordo com Cros, Meizel, (1989) e Raf, (1989), para que se tenha uma avaliação fidedigna da porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossomal, é preciso que a técnica apresente parâmetros exatos, que seja rápido, deve ser capaz de distinguir a reação verdadeira da falsa e não deve comprometer a função espermática.

Para determinação da reação acrossomal usa - se a sonda fluorescente de lecitinas que são aglutininas combinadas ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), que são usadas para verificar a qualidade acrossomal (SUZUKI et al., 2003).

Essas lecitinas a *Arachis hypogaea* -aglutinina do amendoim (PNA) têm predileção específica por algumas moléculas de sacarídeos presentes na matriz acrossomal e ou da membrana acrossomal externa (CHAN et al., 2002; SIRIVAIDYAPONG et al., 2000; FLESCHE et al., 1998; MAGARGEE et al., 1988)

O conjugado de fluorescência FITC-PNA é utilizado como ferramentas para avaliar a integridade do acrossomo em várias espécies, como nos espermatozoides humanos (CROSS, MEIZEL, 1989), os ovinos (MAGARGEE et al., 1988), os suínos (FAZELI et al., 1997), os caninos (SIRIVAIDYAPONG et al., 2000) e os equídeos (CHENG et al., 1996).

O Iodeto de Propídeo (IP) (CROSS, WATSON, 1994) associado ao FITC-PNA permite diferenciar os espermatozoides vivos dos mortos, com reação acrossomal verdadeira e com reação acrossomal falsa (NAGY et al., 2003).

Quando a membrana acrossomal se apresenta intacta e funcional ela se apresenta impermeável ao FITC-PNA, assim não se verifica presença de fluorescência. E quando o espermatozoide sofre reação acrossomal, verificam - se pontos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, torna a membrana porosa, permitindo a entrada do fluorocromo às membranas acrossomais e a seu conteúdo, e o acrossomo apresenta-se corado em verde – reação acrossomal verdadeira. Porém quando acontece a fusão total entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, resulta na perda do acrossomo, e o

espermatozoide apresenta fluorescência no segmento equatorial, ou não demonstra fluorescência (HOLLINSHEAD et al., 2004; KITIYANANT et al., 2002; CHENG et al., 1996; CROSS, MEIZEL, 1989).

O IP identifica pela coloração em vermelho demonstrando as células mortas e em associação com FITC-PNA, pode – se avaliar os espermatozoides com IP e PNA positivo que significa células mortas com acrossomo reagido, caracterizando falsa reação acrossomal, (KITIYANANT et al., 2002; FAZELI et al., 1997).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

A proposta geral deste trabalho é verificar a influência da terapia fotodinâmica e da heparina na indução da reação acrossomal *in vitro* de espermatozoides bovinos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a reação acrossomal;
2. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de heparina sobre a reação acrossomal;
3. Estudar a influência dos agentes indutores (Terapia Fotodinâmica e Heparina) e suas respectivas concentrações sobre a produção *in vitro* de embriões.

#### 4. FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTO I E II

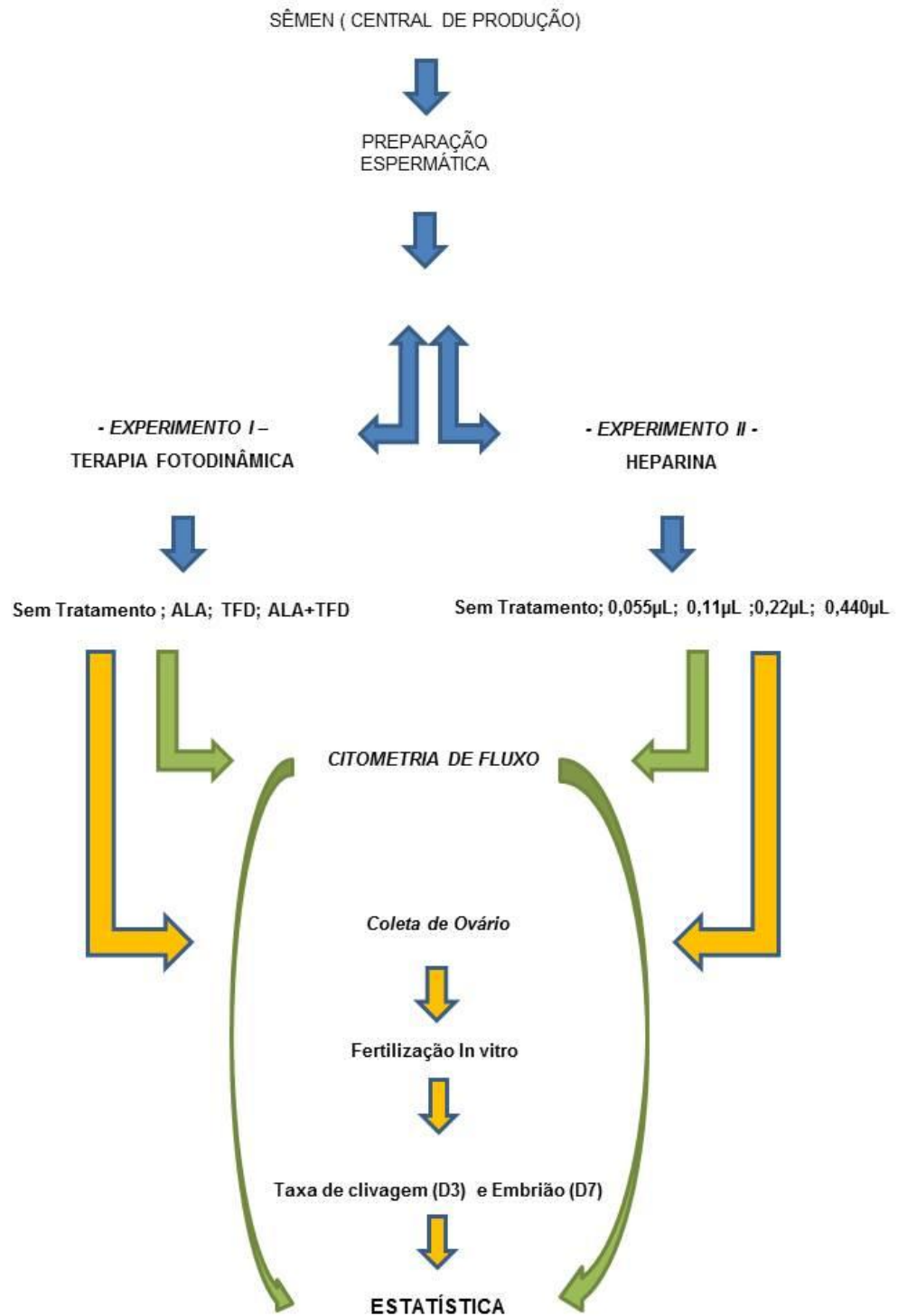


Figura 1. Fluxograma do protocolo Experimental: obtenção do sêmen (descongelamento, 36<sup>0</sup>C por no mínimo 30 segundos, preparação espermática com gradiente de percoll; Dois protocolos de estudo e suas respectivas concentrações; Análise por citometria de fluxo (sondas Iodeto de propídio e PNA-Fitc) e avaliação da taxa de clivagem (D3) e produção de embriões em D7.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS I

### 5.1 EXPERIMENTO I – Terapia Fotodinâmica

#### 5.1.1 Preparação Espermática

As doses de sêmen foram obtidas na central de produção de sêmen Alta Genetics. Para preparação do sêmen foram descongelados seis palhetas de 0,25 ml de sêmen de um único touro da raça Nelore de duas partidas diferentes, em banho-maria à 36°C, após descongelamento as amostras foram colocadas em tubo cônico de 15 ml e diluídas na proporção de 1:20 em solução salina fosfatada (PBS), 250 µl de sêmen para 5 ml de PBS.

#### 5.1.2 Protocolo Terapia fotodinâmica

A definição deste experimento seguiu conforme o trabalho de KrupKa et al., (2011). Definindo o tempo de exposição à luz (120 minutos), potência (10 J/cm<sup>2</sup>), distancia de exposição à luz (4,0 cm), concentração de 120µM do Fotosensibilizador ALA.

Após a preparação de alíquotas de sêmen na concentração de 1x10<sup>6</sup> espz/ml, foram adicionadas em quatro tubos modelo eppendorf (1,5ml) e identificadas conforme tratamento:

- Tubo 1: sem tratamento (somente o sêmen);
- Tubo 2: Amostra de sêmen mais 100µl de ALA (concentração final de 120 µM)
- Tubo 3: Amostras de sêmen mais TFD (comprimento de onda de 610 nm, 120 segundos);
- Tubo 4: Amostra de sêmen mais 100 µl de ALA (concentração final de 120 µM) e TFD ( 610 nm, durante 120 segundos).

Após os tratamentos, todas as amostras foram mantidas a 36<sup>0</sup>C (banho-maria), sem a presença de luz, durante duas horas. Após este período foi realizada avaliação por citometria de fluxo. Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições.

### 5.1.3 Procedimentos de Marcação com Sondas Fluorescentes

Quanto à avaliação da integridade da membrana plasmática e reação acrossomal utilizou-se sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (IP) e PNA-FITC, respectivamente.

Após a preparação do sêmen, os mesmos foram corados com PNA-FITC (1,125 g/ml) e incubados por 10 minutos em banho-maria a 36°C. Em seguida adicionou se IP (1,5 µM) e foram incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente. O critério de análise dos dados correspondentes à fluorescência vermelha, IP (FL3 fotodetector), e verde, PNA-FITC (FL1 Fotodetector), das partículas foram contabilizados. Os espermatozoides que floresceram em vermelho foram classificados com membrana plasmática não íntegra e os que floresceram em verde apresentavam membrana acrossomal reagida. Foram obtidos 50.000 eventos. Análise de interpretação dos dados pelo programa Cell Quest.

## 5.2. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Para o estudo da terapia fotodinâmica na relação com a taxa de clivagem (D3) e produção de embrião (D7). Foram utilizados para este experimento 350 oócitos viáveis.

### 5.2.1 Coleta, recuperação e seleção oocitária.

Os ovários bovinos em diferentes fases do ciclo estral foram coletados no frigorífico Boi Bravo situado no município de Uberaba – MG, de vacas azebuadas (*Bos taurus indicus*) e transportados em garrafa térmica ao laboratório em solução de NaCl a 0,9% a temperatura entre 34 à 36 °C.

No laboratório, os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de todos os folículos visíveis no ovário juntamente com o fluido folicular, utilizando para punção dos mesmos agulhas hipodérmica 40x12 mm e seringa hipodérmica de 10 ml, e colocados em tubos de fundo cônico de 50 ml, acondicionados em banho-maria à temperatura de 37°C por 30 minutos para sedimentação.

Após este período, o sedimento foi depositado em uma placa de Petri estéril de poliestireno de 92x16mm de diâmetro, juntamente com o fluido folicular.

Para o rastreamento foi utilizada lupa estereomicroscópica sob um aumento de 15x. com o auxílio de pipeta de 2-10 µl sob fluxo laminar, os oócitos recuperados foram lavados em M-199 HEPES (acrescido de soro bovino fetal, piruvato e antibiótico) e selecionados para a maturação *in vitro*. Foram considerados viáveis para a maturação *in vitro* (MIV) os oócitos com citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos e que apresentaram células do células compactas com uma a duas camadas conforme descrito na literatura por Gonçalves (2007).

### 5.2.2 Maturação *in vitro* (MIV) oocitária

Após a seleção os complexo cúmulus oocitos (CCOs) foram transferidos para uma placa de petri de 35mm de diâmetro, contendo meio de maturação ( TCM 199 enriquecido com bicarbonato de sódio, soro bovino fetal, pyruvado, antibiótico, hormônios (LH, FSH e estradiol)) e cobertas com óleo mineral estéril, previamente equilibrada em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Os oócitos foram distribuídos em quatro gotas contendo 100 µl de meio MIV com 25 oócitos cada. Foram mantidos por 24 horas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

### 5.2.3 Preparação do sêmen

Para preparação do sêmen foram descongelados seis doses de sêmen de um único touro da raça Nelore de duas partidas diferentes. O método de separação dos espermatozoides

dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

As palhetas de sêmen (0,25 ml) congeladas foram descongeladas em banho-maria a 36°C durante 30 segundos.

Em quatro tubos de polipropileno de 1,5 ml, preparou – se o percoll no gradiente de concentração de 90% e 45% na proporção de 1:1 ( camada inferior do tubo percoll 90% (450 ml) no meio percoll à 45%(450 ml) e na camada superior o sêmen descongelado juntamente com o diluidor).

Em seguida os tubos foram colocados em microcentrífuga com rotação de 600g por sete minutos, após a centrifugação o pellet formado ao fundo do tubo (constituído por células viáveis) dos quatro tubos foram retirados e transferidos para um único tubo contendo 150 µl de meio sêmen (TL stock acrescido por pyruvato e antibiótico). 30 µl desta solução foram colocados em lâmina/lamínula.

Os espermatozoide foram avaliados quanto a motilidade progressiva 50% e vigor 3 em microscópio óptico no aumento de 10x, em seguida foi quantificada a recuperação espermática em 90µl e distribuído igualmente em quatro tubos de polipropileno de 1,5 ml e devidamente identificados como 1, 2, 3 e 4, conforme delineamento deste experimento.

#### 5.2.4.1 Delineamento experimento I - Produção *in vitro* de Embriões na TFD

- Tubo 1 – SEM TRATAMENTO (sem adição de TFD e ALA) adicionado 22,5 µl de sêmen preparado conforme descrito acima;
- Tubo 2 - ALA (100µl) adicionado 22,5 µl de sêmen preparado conforme descrito acima;
- Tubo 3 – Exposto TFD (comprimento de onda de 610nm, durante um período de 120 segundos) e adicionado 22,5 µl de sêmen preparado conforme descrito acima;
- Tubo 4 - ALA (100µl) e TFD (comprimento de onda de 610nm, durante um período de 120 segundos) e adicionado 22,5 µl de sêmen preparado conforme descrito acima;

Após o procedimento dos tratamentos, foi adicionado 10 µl da solução obtido dos tratamentos a gotas de 100 µl de meio FIV (Meio FIV stock enriquecido com albumina sérica

bovina (BSA), heparina 140 USP/MG – Sigma (H-9399), antibiótico, PHE e piruvato), distribuídas em uma placa de petri de 35 mm, coberta com óleo mineral estéril, previamente equilibrado em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Os oócitos maturados por 24 horas foram lavados em meio de FIV e transferidos para a placa contendo meio FIV e os respectivos tratamentos, sendo que cada gota contida na placa foi identificada conforme delineamento do experimento. Após, foram acondicionadas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida por 20 horas.

### 5.2.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fecundação *in vitro* (20 horas), os prováveis zigotos foram transferidas para uma placa de petri 92x16mm e desnudadas através de movimentos repetidos e cadenciados com uma pipeta de 50 µl, em meio FIV.

Na sequência, foram lavados em meio CIV (Fluído Sintético do Oviduto – SOF) acrescido de BSA, SBF, antibiótico e piruvato, em seguida transferidos para placa contendo meio de CIV, em placa de petri de 35mm com 4 gotas de 100 µl de meio devidamente identificada conforme tratamentos utilizados e cobertas por óleo mineral estéril, sendo esta placa previamente equilibrada por 1 hora em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, 5% N<sub>2</sub>, e 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Os prováveis zigotos foram co-cultivadas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3130) a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de N<sub>2</sub> em umidade saturada por 3 dias.

No terceiro dia após a FIV, fase esta chamada de D3, os prováveis zigotos foram avaliados e observados para quantificar o índice de clivagem. Foram consideradas clivadas as estruturas que apresentarem quatro ou mais blastômeros. Após 7 dias da FIV estas células foram novamente avaliadas quanto a taxa de formação de embrião.

Todos os procedimentos em que as células oocitárias, espermáticas, zigotos e embriões foram manipulados foram procedidos em Fluxo laminar.

### 5.3 ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad prism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão (cinco repetições) A comparação de dados entre grupos controles e tratados foi realizada utilizando teste paramétrico One way ANOVA, com pós teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,0001$ .



## 6 RESULTADOS

### 6.1 EXPERIMENTO I – Terapia Fotodinâmica

No procedimento experimental pela terapia fotodinâmica, observa-se uma tendência positivas quando comparado ao experimento com heparina, na análise dos dados IP negativo e PNA negativo (52,4% e 39,2%), mostrando uma similaridade entre as amostras de estudo, pois não apresentam diferença estatística significativa.

Na análise dos dados no experimento da TFD, para o parâmetro IP negativo e PNA negativo, o tratamento com TFD apresenta significância estatística quando comparado às células sem tratamento (39,2%) e células tratada com ALA (44,1%). Na análise do tratamento com ALA+TFD (25,2%) observou-se significância na comparação com as células tratadas com ALA (44,1%) e células tratadas com TFD (4,8%) e significância estatística na análise das células não tratadas (39,2%) *versus* células tratadas com ALA+TFD (25,2%) (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão nas análises de espermatozoides bovinos, pós-congelamento por citometria de fluxo, após o tratamento com TFD.

Relação IP/PNA	Tratamento fotodinâmico				p-value
	Controle	ALA	TFP	ALA + TFP	
IP negativo /PNA negativo	39,2 ± 3,1 <sup>a</sup>	44,1 ± 7,2 <sup>a</sup>	4,8 ± 3,4 <sup>c</sup>	25,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	< 0,0001
IP positivo/ PNA positivo	0,2 ± 0,1 <sup>d</sup>	26,2 ± 3,1 <sup>bc</sup>	51,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	32,2 ± 2,3 <sup>b</sup>	< 0,0001
IP positivo / PNA negativo	56,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,5 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	< 0,0001
IP negativo / PNA positivo	3,7 ± 3,0 <sup>c</sup>	27,6 ± 5,2 <sup>b</sup>	39,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	41,2 ± 2,1 <sup>a</sup>	< 0,0001
<b>Total de células</b>	100%	100%	100%	100%	

Análise experimental dos testes de capacitação utilizando indutor (ALA), terapia fotodinâmica (TFD) e indutor mais terapia fotodinâmica (ALA+TFD): a) (IP negativo/PNA negativo) sem marcação dos corantes – células integras; b) (IP positivo/PNA positivo) dupla marcação dos corantes - Lesão na membrana plasmática e acrossomal. Total de células 100%, corresponde a 50.000 eventos avaliados no citometro de fluxo. Considerar diferença estatística na mesma linha ( p<0,0001).

Quando a marcação dupla observa-se nas células tratadas com terapia fotodinâmica na ausência do indutor ALA, apresentaram valores médios de 51,7%, para um número maior de células quando comparado aos demais tratamentos.

Ao observar o experimento com heparina somente às células com lesão na membrana plasmática, sem a indução da capacitação (IP positivo/PNA negativo) são similares aos observados no experimento II com valor médio de 56,8% significativo, quando comparado aos demais tratamentos. Observando a análise dos demais tratamentos observa-se significância estatísticas com valores de ALA (2,1%) *versus* TFD (3,5%) e TFD (3,5%) *versus* ALA + TFD (1,6%).

Analisando somente os dados de espermatozoide reagidos “capacitados” (IP negativo/PNA positivo), verifica-se um número muito baixo de células reagidas sem tratamento (3,7%) mais altamente significativo quando comparado aos demais tratamentos. Observa-se significância estatística quando comparado tratamento ALA (27,6%) *versus* tratamento TFD (39,9%) e tratamento ALA (27,6%) *versus* Tratamento ALA+TFD (41,2%). E nenhuma diferença entre os tratamentos TFD (39,9%) *versus* tratamento ALA+TFD (41,2%). (Figura 2)

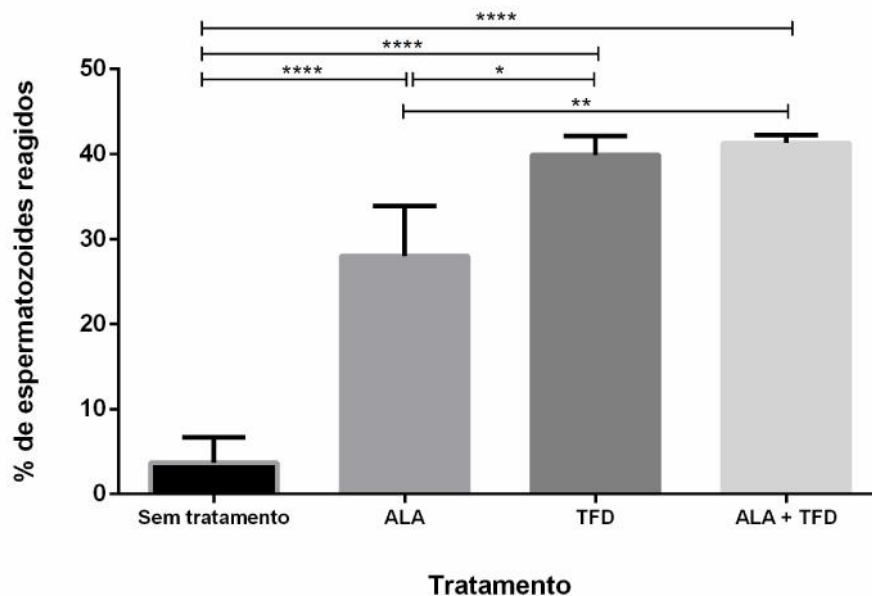


Figura 2. Análise experimental dos testes de capacitação indutor (ALA), terapia fotodinâmica (TFD) e indutor mais terapia fotodinâmica (ALA+TFD): (IP negativo/PNA positivo) Porcentagem de células que sofreram capacitação sem lesão na membrana plasmática. Significância estatística ( $p < 0,0001$ ).

Na avaliação da porcentagem da taxa de clivagem após tratamento com bioestimulador. Observou-se extrema significância estatística no grupo sem tratamento

(83,8%) quando comparado ALA (32,3%); TFD (57,3%) e ALA+TFD (42,6%). Alta significância estatística ente o tratamento ALA (32,3%) *versus* TFD (57,3%). Media significância estatística entre os tratamentos ALA (32,3%) *versus* ALA+TFD (42,6%), esta mesma significância foi observada entre os tratamentos TFD (57,3%) *versus* ALA+TFD (42,6%) (Figura 3).

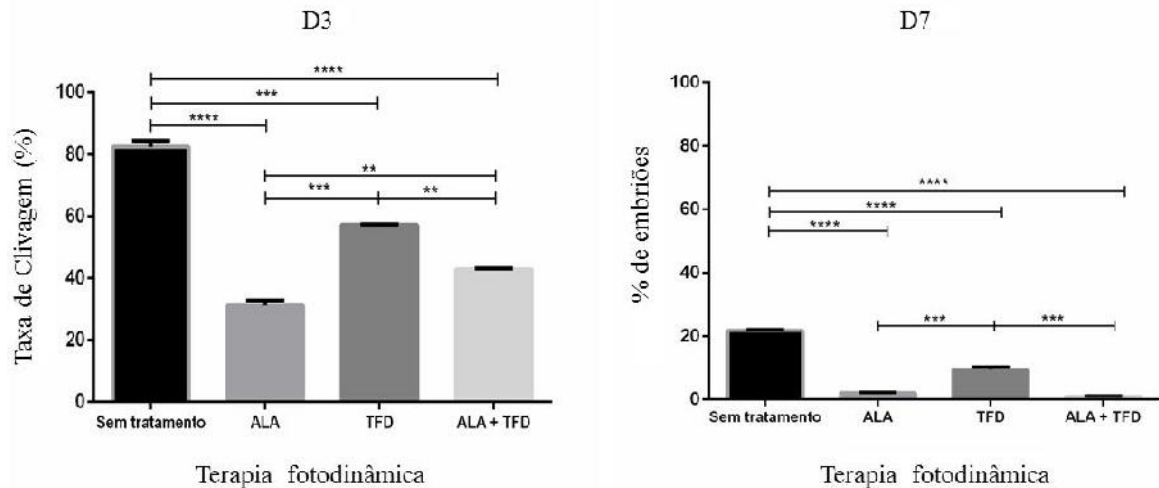


Figura 3. Análise experimental dos testes de fertilização in vitro utilizando indutor (ALA), terapia fotodinâmica (TFD) e indutor mais terapia fotodinâmica (ALA+TFD): **a)** porcentagem da taxa de clivagem (D3); **b)** porcentagem de embrião em D7; (\*) baixa significância estatística; (\*\*) média significância estatística; (\*\*\*) alta significância estatística (\*\*\*\*) Extremamente significativa. Considerar diferença estatística ( $p < 0,0001$ ).

Na análise da porcentagem de embriões produzidos em D7, Observou-se extrema significância estatística no grupo sem tratamento (21,6%) quando comparado ALA (2,2%); TFD (9,0%). e ALA+TFD (1,1%). Alta significância estatística ente o tratamento ALA (2,2%) *versus* TFD (9,0%) e TFD(9,0%) *versus* ALA+TFD(1,1%), na análise entre ALA(2,2%) *versus* ALA+TFD (1,1%), não foi observado diferença estatística entre os tratamentos. (Figura 3).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 EXPERIMENTO I – Terapia Fotodinâmica

Na avaliação da TFD, como indutor da RA, empregou-se dois pontos de estudo: uma molécula fotossensível e uma baixa dosagem de luz visível, que combinados na presença de oxigênio poderiam estimular uma resposta celular (ZANCALENA, 2009).

Ao analisarmos os tratamentos tendo como indutor da RA, a TFD, pode se inferir que este agiu positivamente, pois os resultados demonstram um número superior de células reagidas em comparação aos demais tratamentos figura 2.

Este efeito indutor foi descrito por Coll (1987) que destaca a luz como possível modificador do potencial elétrico das membranas celulares modificando a síntese de ATP.

A hipótese criada para este efeito é que o mecanismo de capacitação espermática é dependente de adenilciclase (AC) e a simultânea produção de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), assim uma modificação no potencial elétrico da membrana acarretaria uma maior produção de adenilciclase, e isto levaria a ativação da PKA que promoveria redistribuição e translocação de fosfolipídios.

A entrada de pequenas quantidades de cálcio nas células espermáticas teria como função a capacitação e consequente reação acrossomal (FLESCHE, GADELLA, 2000).

Outro ponto positivo quanto à estimulação foi à utilização do fotossensibilizador ALA, que como a TFD, também apresentou resposta positiva para a RA.

A ação mediada pelo ALA e TFD sobre a RA não é descrita na literatura. Assim a hipótese que é apresentada descreve a ação do fármaco fotossensibilizador após a irradiação com luz visível, que pode gerar espécies como radicais livres ( $O_2^-$ ; OH) e outras espécies reativas de oxigênio (EROS), como relatado por Zancalena, (2009).

Este mecanismo vai de encontro aos mecanismos bioquímicos relatados por Lamirande et al. (1997), em que a hiperativação, capacitação e reação acrossômica “*in vitro*”, podem ser ativadas na presença Radicais livres, como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico ( $NO_3$ ), o que explicaria os resultados apresentados na figura 2.

Na associação do indutor juntamente com o fotossensibilizador, podemos também inferir que a TFD, além de capacitar provocando a RA, sem o auxílio do fotossensibilizador,

melhora a ação deste em capacitar e reagir o acrossoma das células espermáticas, corroborando com o trabalho de Iaffaldano et al., (2010), ao afirmar que em seus estudos usando como modelo experimental o coelho, observou que o efeito do laser acarreta a uma maior integridade da membrana plasmática e acrossomal, contribuindo para capacitação espermática.

Ao avaliarmos os resultados obtidos no uso da TFD e ALA na produção *in vitro* de embriões, somente do grupo controle, pode se observar que os resultados demonstrados quanto à fase de clivagem e fase de blastocisto, apresentam maior índice de clivados e blastocistos, sendo este resultado inesperado já que não passou por nenhum tratamento figura 3.

Em análises do índice de produção na fase de clivagem (D3), comparando os resultados obtidos entre os tratamentos, observa se que se destaca TFD, demonstrando que a indução espermática por luz pode ocorrer *in vitro*.

Este efeito poderia estar relacionado à ação da luz sobre a cadeia redox da mitocôndria, que como no espermatozoide, também potencializaria as mesmas respostas celulares.

Entretanto estes efeitos podem interferir no aumento da síntese de DNA e RNA, como também no aumento da permeabilidade da membrana aos íons de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (KARU, 1985), o que poderia levar a morte celular. Assim ao analisar somente o ALA observa-se uma diminuição nos índices de clivagem, e ao associar o ALA com TFD, este demonstra melhora no índice de clivagem, inferindo assim, que a TFD é uma ferramenta considerável no uso da RA *in vitro*. Conforme literatura estudada, o efeito da irradiação depende do comprimento de onda, potência e tempo de exposição e dose de irradiação ou fluência (HARRIS, 1988; KARU, 1988).

Estudos apontam que o tempo de estimulação e o potencial de luz, além da dose dos indutores podem aumentar ou deprimir processos fisiológicos. Que em tese causariam destruição das estruturas biológicas, como lesão da cromatina, podendo ocasionar uma lipoperoxidação ou aquecimento de proteínas provocando sua desnaturação (GIROTTI, 2001; KARU, 1998; KARU 1994), o que explicaria o baixo índice de clivagem.

Sendo assim os resultados apresentados por este experimento sugere a necessidade de novos estudos para adequar o tempo de estimulação e o potencial de luz a fim de obter melhores resultados.

## 8 MATERIAL E METODOS II

### 8.1 EXPERIMENTO II – Heparina

#### 8.1.1 Preparação espermática

Para preparação do sêmen foram descongelados seis doses de sêmen de um único touro da raça Nelore de duas partidas diferentes. O método de separação dos espermatozoides dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

As palhetas de sêmen (0,25 ml) congeladas foram descongeladas em banho-maria a 36°C durante 30 segundos.

Em quatro tubos de polipropileno de 1,5 ml, preparou – se o percoll no gradiente de concentração de 90% e 45% na proporção de 1:1 ( camada inferior do tubo percoll 90% (450 ml) no meio percoll à 45%(450 ml) e na camada superior o sêmen descongelado juntamente com o diluidor).

Em seguida os tubos foram colocados em microcentrífuga com rotação de 600g por sete minutos, após a centrifugação o pellet formado ao fundo do tubos (constituído por células viáveis) dos quatro tubos foram retirado e transferidos para um único tubos contendo 150 µl de meio sêmen (TL stock acrescido por pyruvato e antibiótico). 30 µl desta solução foram colocados em lâmina/lamínula.

Os espermatozoide foram avaliados quanto a motilidade progressiva 50% e vigor 3 em microscópio óptico no aumento de 10x, em seguida foi quantificada a recuperação espermática em 655 µl e distribuído igualmente em cinco tudo tipo eppendorff de 1,5 ml e devidamente identificados como: Sem tratamento - 0,11 µl – 0,055 µl – 0,22 µl e 0,44 µl. Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições.

### 8.1.2 Protocolo Heparina

Após a preparação alíquotas de sêmen na concentração de  $1 \times 10^6$  espz/ml, foram adicionadas em cinco tubos modelo eppendorf (1,5mL) e identificadas conforme tratamento:

- Tubo 1 – SEM TRATAMENTO (sem adição de heparina)
- Tubo 2 - 0,11  $\mu$ l de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 3 – 0,055  $\mu$ l de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 4 - 0,22  $\mu$ l de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 5 - 0,44  $\mu$ l de heparina em 1 ml de Meio FIV.

### 8.1.3 Procedimentos de Marcação com Sondas Fluorescentes

Quanto à avaliação da integridade da membrana plasmática e reação acrossomal utilizou-se sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (IP) e PNA-FITC, respectivamente.

Após a preparação do sêmen, os mesmos foram corados com PNA-FITC (1,125 g/ml) e incubados por 10 minutos em banho-maria a 36°C. Em seguida adicionou se IP (1,5 mM) e foram incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente.

O critério de análise dos dados correspondentes à fluorescência vermelha, IP (FL3 fotodetector), e verde, PNA-FITC (FL1 Fotodetector), das partículas foram contabilizados.

Os espermatozoides que floresceram em vermelho foram classificados com membrana plasmática não íntegra e os que floresceram em verde apresentavam membrana acrossomal externa não intacta. Foram analisados 50.000 eventos. Análise de interpretação dos dados pelo programa Cell Quest.

## 8.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Para o estudo das diferentes concentrações de em relação com a taxa de clivagem (D3) e produção de embrião (D7). Foram utilizados para este experimento 1201 oócitos viáveis.

### 8.2.1 Coleta, recuperação e seleção oocitária.

Os ovários bovinos em diferentes fases do ciclo estral foram coletados no frigorífico Boi Bravo situado no município de Uberaba – MG, de vacas azebuadas (*Bos taurus indicus*) e transportados em garrafa térmica ao laboratório em solução de NaCl a 0,9% a temperatura entre 34 à 36 °C.

No laboratório, os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de todos os folículos visíveis no ovário juntamente com o fluido folicular, utilizando para punção dos mesmos agulhas hipodérmica 40X12 mm e seringa hipodérmica de 10 ml, e colocados em tubos de fundo cônico de 50 ml, acondicionados em banho-maria à temperatura de 37°C por 30 minutos para sedimentação.

Após este período, o sedimento foi depositado em uma placa de Petri estéril de poliestireno de 92x16mm de diâmetro, juntamente com o fluido folicular.

Para o rastreamento foi utilizada lupa estereomicroscópica sob um aumento de 15x. com o auxílio de pipeta de 2-10 µl sob fluxo laminar, os oócitos recuperados foram lavados em M-199 HEPES e selecionados para a maturação *in vitro*. Foram considerados viáveis para a MIV os oócitos com citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos e que apresentem células do *cumulus oophorus* compactas com uma e duas camadas e ooplasma homogêneo conforme descrito na literatura por Gonçalves et al., (2007).

### 8.2.2 Maturação *in vitro* (MIV) Oocitária

Após a seleção os CCOs foram transferidos para uma placa de petri de 35mm de diâmetro, contendo meio de maturação ( TCM 199 enriquecido com bicarbonato de sódio,



soro bovino fetal, piruvado, antibiótico, hormônios (LH, FSH e estradiol) e cobertas com óleo mineral estéril, previamente equilibrada em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Os oócitos foram distribuídos em quatro gotas contendo 100 µl de meio MIV com 25 oócitos cada. Foram mantidos por 24 horas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

### 8.2.3 Preparação do sêmen

Para preparação do sêmen foram descongelados seis doses de sêmen de um único touro da raça Nelore de duas partidas diferentes. O método de separação dos espermatozoides dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

As palhetas de sêmen (0,25 ml) congeladas foram descongeladas em banho-maria a 36°C durante 30 segundos. Em quatro tubos de 1,5 ml, preparou-se o percoll no gradiente de concentração de 90% e 45% na proporção de 1:1 (camada inferior do eppendorff percoll 90% (450 ml) no meio percoll à 45% (450 ml) e na camada superior o sêmen descongelado juntamente com o diluidor.

Em seguida os tubos foram colocados em microcentrífuga com rotação de 600g por sete minutos, após a centrifugação o pellet formado ao fundo do tubo (constituído por células supostamente viáveis) dos quatro eppendorffs foram retirado e transferidos para um único tubo contendo 150 µl de meio sêmen (TL stock acrescido por piruvato e antibiótico).

Foram colocados em lâmina/lamínula 30 µl desta solução e os espermatozoide foram avaliados quanto a motilidade progressiva 50% e vigor 3 em microscópio óptico no aumento de 10x, em seguida foi quantificada a recuperação espermática em 90µl e distribuído igualmente em quatro todo tipo eppendorff de 1,5 ml e devidamente identificados como 1, 2, 3, 4 e 5 conforme delineamento deste experimento.

#### 8.2.3.1 Delineamento experimento II – Produção *in vitro* de Embriões

- Tubo 1 - SEM TRATAMENTO (sem adição de heparina)
- Tubo 2 - 0,11 µl de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 3 - 0,055 µl de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 4 - 0,22 µl de heparina em 1 ml de Meio FIV;
- Tubo 5 - 0,44 µl de heparina em 1 ml de Meio FIV.

Após o procedimento dos tratamentos, foi adicionado 10 µl da solução (respectivos tratamentos) em gotas de 100 µl de meio FIV (Meio FIV stock enriquecido com albumina sérica bovina (BSA), heparina 140 usp/MG – Sigma (H-9399), antibiótico, PHE e pyruvato), distribuídas em uma placa de petri de 35 mm, coberta com óleo mineral estéril, previamente equilibrado por 1 hora em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Estas placas foram identificadas conforme delineamento desse experimento e as gotas de Meio FIV utilizadas foram às preparadas nos tratamentos conforme delineamento descrito acima.

Os oócitos maturados por 24 horas foram lavados em meio de FIV e transferidos para a placa contendo meio FIV e os respectivos tratamentos. Após foram acondicionadas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida por 20 horas.

#### 8.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fecundação *in vitro* (20 horas), os prováveis zigotos foram transferidas para uma placa de petri 92x16mm e desnudadas através de movimentos repetidos e cadenciados com uma pipeta de 50 µl, em meio FIV. Na sequência, foram lavados em meio CIV (Fluído Sintético do Oviduto – SOF) acrescido de BSA, antibiótico e pyruvato.

Em seguida transferidos para placa contendo meio de CIV, em placa de petri de 35mm distribuído 4 gotas de 100 µl de meio devidamente identificada conforme tratamentos utilizados e cobertas por óleo mineral estéril, sendo esta placa previamente equilibrada por 1 hora em incubadora Thermo Scientific (modelo 3110) a 5% CO<sub>2</sub>, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida.

Os prováveis zigotos foram co-cultivadas em incubadora Thermo Scientific (modelo 3130) a uma temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de N<sub>2</sub> em umidade saturada por 3 dias.

No terceiro dia após a FIV, fase esta chamada de D3, os prováveis zigotos foram avaliados e observados para quantificar o índice de clivagem. Foram consideradas clivadas as estruturas que apresentarem quatro ou mais blastômeros. Após 7 dias da FIV estas células foram novamente avaliadas quanto a taxa de formação de embrião.

Todos os procedimentos em que as células oocitárias, espermáticas, zigotos e embriões foram manipulados foram procedidos em Fluxo laminar.

### 8.3 ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad prism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão (cinco repetições). A comparação de dados entre grupos controles e tratados foi realizada utilizando teste paramétrico One way ANOVA, com pós teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,0001$ .

## 9 RESULTADO

### 9.1 EXPERIMENTO II – Heparina

Inicialmente a técnica de citometria de fluxo propiciou um número maior de células avaliadas (50.000 eventos) em um período curto de tempo. Além de possibilitar a avaliação de dois parâmetros celulares distintos, simultaneamente. As especificidades dos corantes corroboram para este tipo de análise. O Iodeto de propicio determina a avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, com sua especificidade para a marcação do DNA espermático (vermelho), somente quando membrana plasmática esta lesionada. O corante PNA-FITC determina a sua marcação (verde), quando marca a membrana acrossomal externa do espermatozoide. Identificando o início da reação acrossomal. Espermatozoides considerados com membrana plasmática e acrossomal íntegros apresentaram como IP negativo e PNA negativo. Denota-se esta observação entre os grupos tratados com heparina. Estas células foram consideradas células que não sofreram lesões na membrana plasmática e não sofreram RA. Observa-se na tabela (2) que há diferenças estáticas entre alguns tratamentos. Com significância estatística entre as células sem heparina (sem tratamento) vs Tratamento a 0,11 $\mu$ l (52,4% vs 38%); sem tratamento vs tratamento 0,055 $\mu$ l (52,4% vs 35,4%); tratamento 0,11 $\mu$ l vs tratamento 0,44 $\mu$ l (38% vs 53,9%), tratamento 0,055 $\mu$ l vs tratamento 0,44 $\mu$ l (35,4% vs 53,9%); sem tratamento (52,4%) vs tratamento 0,22 $\mu$ l (43,7%); tratamento 0,22 $\mu$ l (43,7%) vs tratamento 0,44 $\mu$ l (53,9%);tratamento 0,055 $\mu$ l vs tratamento 0,22 $\mu$ l (35,4% vs 43,7%).

Tabela 2. Média e desvio padrão nas análises de espermatozoides bovinos, pós-congelamento por citometria de fluxo, após o tratamento com heparina.

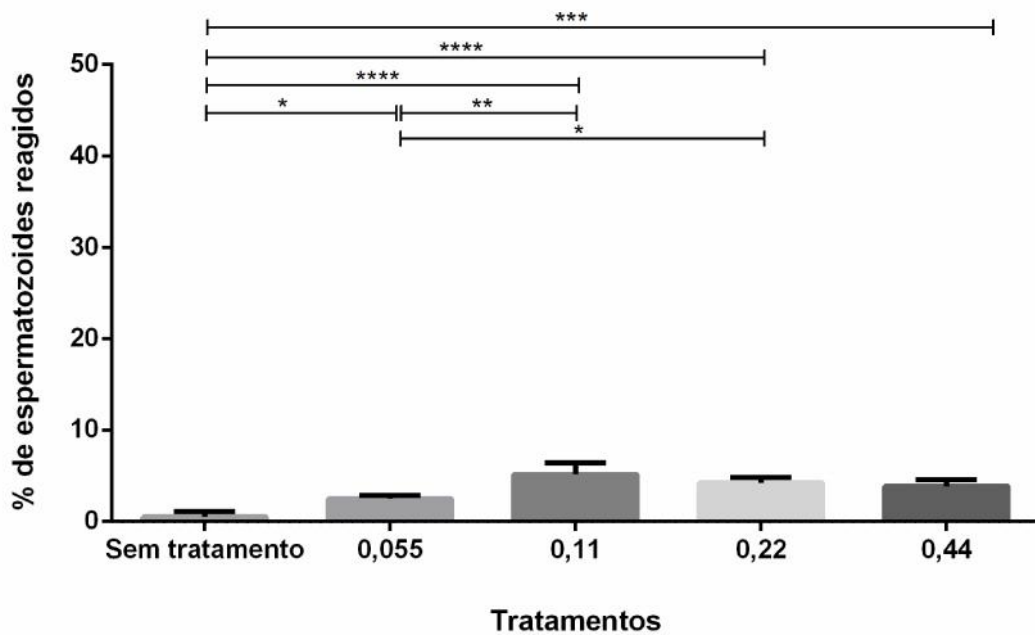
Relação IP/PNA	Tratamento com heparina (%)					<i>p-value</i>
	0	0,055 µl	0,11 µl	0,22 µl	0,44 µl	
IP negativo /PNA negativo -	52,4 ± 2,5 <sup>a</sup>	35,4 ± 2,6 <sup>c</sup>	38 ± 3,7 <sup>bc</sup>	45,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	53,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	< 0,0001
IP positivo/ PNA positivo -	2,4 ± 2,7 <sup>c</sup>	13,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	17 ± 1,7 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,5 <sup>ab</sup>	11,6 ± 1,6 <sup>b</sup>	< 0,0001
IP positivo / PNA negativo -	44,8 ± 2,0 <sup>a</sup>	48,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	39,8 ± 4,7 <sup>b</sup>	37,1 ± 4,7 <sup>b</sup>	30,7 ± 3,1 <sup>bc</sup>	< 0,0001
IP negativo / PNA positivo -	0,4 ± 0,6 <sup>d</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>c</sup>	5,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,6 <sup>ac</sup>	3,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	< 0,0001
Total de células	100%	100%	100%	100%	100%	

Análise experimental dos testes de capacitação utilizando diferentes concentrações de Heparina. a) (IP negativo/PNA negativo) sem marcação dos corantes – células viáveis; b) (IP positivo/PNA positivo) dupla marcação dos corantes - Lesão na membrana plasmática e acrossomal. c) (IP positivo/PNA negativo) Lesão na membrana plasmática sem apresentar reação acrossômica; d) (IP negativo/PNA positivo). Total de células 100%, corresponde a 50.000 eventos avaliados no citometro de fluxo. Considerar diferença estatística na mesma linha (p<0,0001).

Todas as células que sofreram dupla marcação (IP positivo/ PNA positivo), com diferença estatística entre todos os tratamentos. Com valores médios abaixo de 20% das células totais avaliadas. Todavia análise estatística observa-se significância estatística entre o grupo sem tratamento vs os demais grupos.

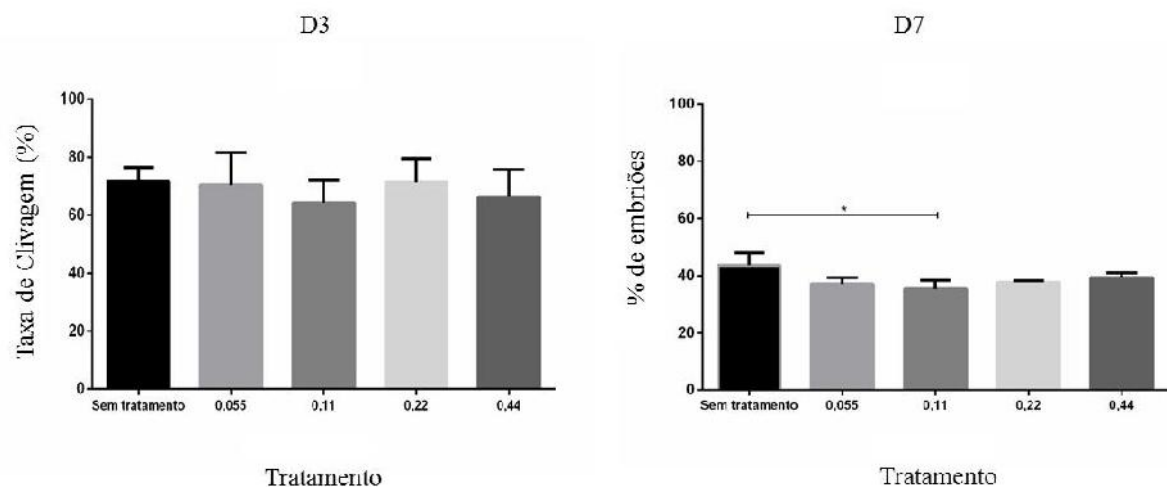
As células espermáticas que sofreram algum dano à membrana plasmática sem apresentar reação acrossômica (IP- positivo e PNA negativo), observa-se diferença estatística entre o tratamento 0,055 µl e tratamento 0,44µl (48% vs 30,7%); células sem tratamento vs tratamento 0,44µl (43,2% vs 32,74%).

Na análise de espermatozoide com membrana plasmática íntegra (IP negativo) e acrossoma reagido (PNA positivo) (Figura 4). A uma tendência maior para a RA para o tratamento com 0,11µl de heparina, quando comparado aos demais tratamentos. Com valor médio de 4,7% de espermatozoides reagidos. Observa-se que as células que não estavam em presença do tratamento apresentaram valor médio de 0,4%, apresentando significância estatística (p<0,01) quando comparado ao tratamento 0,22µl (4,2%); o tratamento 0,11µl (5,1%) apresenta significância estatística para o tratamento 0,44µl (3,8%) e para o tratamento 0,055 µl (2,5%).



**Figura 4.** Análise experimental dos testes de capacitação utilizando diferentes concentrações de Heparina. Porcentagem de células que sofreram capacitação sem lesão na membrana plasmática. Significância estatística ( $p < 0,0001$ ).

De acordo com análise dos dados demonstrados no gráfico, pode se observar que não houve diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,0001$ ), entre os tratamentos na avaliação da taxa de clivagem (Figura 5), onde todos os grupos em comparação ao grupo sem tratamento obtiveram média superior a 60%. Todavia os resultados sugerem uma tendência maior para o tratamento com heparina a 0,055 $\mu$ l e 0,22 $\mu$ l com taxa de clivagem superior a 80%.



**Figura 5.** Análise experimental dos testes de fertilização in vitro de utilizando diferentes concentrações de Heparina. **a)** porcentagem da taxa de clivagem (D3); **b)** porcentagem de embrião em D7; (\*) Significância, ( $p < 0,0001$ ).

Na avaliação da porcentagem de embriões produzidos (D7), observa-se significância estatística ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo sem tratamento (44,9%) *versus* o tratamento com 0,11 $\mu$ l (37,2%). E nenhuma diferença estatística ( $p > 0,0001$ ), entre os demais tratamentos (Figura 5).

## 10 DISCUSSÃO

### 10.1 EXPERIMENTO II – Heparina

Neste experimento foram avaliadas a integridade de membrana plasmática (MP) e reação acrossomal, em espermatozoides que foram tratados com diferentes doses de heparina.

Ao analisar os dados obtidos pela citometria de fluxo quanto ao parâmetro (IP negativo/PNA positivo), porcentagem de células que sofreram reação acrossomal sem lesão na membrana plasmática (Figura 4), observa-se que o tratamento com volume de heparina 0,11 $\mu$ L, obteve um maior número de células que sofreram RA, comparado aos outros tratamentos.

A efetividade da heparina como indutor da RA foi descrita por Fukui, Mochizuki e Sonoyama (1990), descrevendo as características físico-químicas, ressaltando que a mesma é o glicosaminoglicano mais potente para capacitar espermatozoides bovino. Parrish et al., (1988), relataram que a concentração de heparina pode interferir em respostas fisiológicas da capacitação e consequente RA, tanto na membrana plasmática quanto acrossomal, resultado este também observado no presente trabalho ao analisar os diferentes tratamentos de heparina quanto a integridade da membrana plasmática, tabela 2.

Esta resposta bioquímica foi descrita por Therien et al. (2001), que descreveram que esta resposta fisiológica à capacitação pode ser a ação de glicosaminoglicanas, uma vez que estas se ligam às proteínas do plasma seminal bovino (BSP).

A maior concentração de heparina poderia propiciar uma maior interação com as proteínas BSP, e desta forma potencializar a capacitação espermática induzida por estas moléculas e por conseguinte promovendo a reação acrossômica (THERIEN et al., 2005).

Assim as BSP proteínas, induziriam alterações na membrana plasmática do espermatozoide, estimulando a saída do colesterol e fosfolípidios (THERIEN, et al., 1998).

Esta indução potencializada pela interação com a heparina aumentaria a concentração intracelular de cálcio, pH e cAMP, que a princípio sugere-se necessária para iniciar a via de sinalização da capacitação. Esta resposta também é bem semelhante às vias de bicarbonato, adenosina, cafeína, e espécies reativas de oxigênio (ROS), descritas por Colenbrander e Gadella (2003).



Por conseguinte, as células que apresentaram lesão em sua grande maioria estariam relacionadas a processos pertinentes à criopreservação, já que com a criopreservação, observa-se uma queda significativa da viabilidade espermática em razão de efeitos osmóticos (crioprotetores) e das curvas de congelamento (YOSHIDA, 2000).

Portanto, verifica-se que o processo de criopreservação, aumenta a fragilidade celular, resultando na ruptura e desestabilidade das membranas durante este processo, e possivelmente induzindo a criocapacitação.

Ao analisarmos os diferentes volumes de heparina utilizadas na produção *in vitro* de bovinos, sendo na fase de clivagem quanto na fase de blastocisto, não houve diferença estatística, embora, na fase de blastocisto tenha ocorrido uma menor taxa de conversão embrionária comparado com a fase de clivagem.

Esse fato pode ser explicado através dos estudos feitos por Barners e Eyestone, (1990), Barners e First, (1990) e Xu et al., (1987), onde concluíram que em bovinos, a primeira clivagem acontece aproximadamente de 26 a 32 horas após a FIV. Lundin et al., (2001), complementam dizendo que a velocidade de desenvolvimento embrionário está correlacionado com a primeira clivagem, já que não avaliamos individualmente a primeira clivagem em termos cinéticos, inferimos que houve o aceleração evolutivo e ou retardado de algumas células.

Quando observa-se o desempenho dos grupos entre eles, constata-se que não houve diferença estatísticas entre eles seja na fase de D3 quanto na fase D7, sugerindo que a

heparina como indutor de RA para raça nelore independe da concentração de heparina e ou do uso da heparina utilizada para que ocorra a reação acrossômica, principalmente quando observa-se o desempenho dos tratamentos na fase de clivagem, fato este não encontrado na literatura consultada.

Todavia cria-se a possibilidade de discussão do efeito da criocapacitação do espermatozoide bovino, possivelmente, este efeito pode estar relacionado a mudança conformacional de fosfolipídios da membrana plasmática, devido aos efeitos da criogenia, uma vez que este promoveria a abertura de canais iônicos de  $Ca^{+2}$ , o que favoreceria a interação do espermatozoide com o oócitos (BEVERS et al., 1999).

Esta hipótese poderia explicar o resultado apresentado na figura 5, uma vez que as células sem tratamentos apresentaram resultados de porcentagem da taxa de clivagem (D3) e porcentagem de embrião em D7, semelhantes aos das células tratadas. EFEITO DO PERCOLL NA CAPACITAÇÃO

Ao correlacionar os dados de indução da reação acrossômica da heparina com a terapia fotodinâmica, conclui-se que a ação da terapia fotodinâmica induz em até 6 vezes a reação acrossômica *in vitro* quando comparado ao melhor resultado com heparina ( 5,1%), tanto na presença do foto indutor ( 27,6%) quanto somente na presença de luz (39,9%).

Sugere-se que neste mecanismo, o efeito excitação das moléculas, por mudança no potencial redox. Este por sua vez agiria na regulação cinética de vias bioquímicas, como das proteínas Kinase, que poderiam estar relacionadas a mecanismos de transportes através da membrana (KARU, 1998).

E que a ação do fotossensibilizador ácido 5 – aminolevulinico (ALA) poderia atuar de forma sinérgica no transporte ativo, como  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , dependente de beta aminoácidos como glicina e ácido gama aminobutírico (GABA) (CALZAVARA et al., 2009).

Estes efeitos estimulariam a ativação de transporte ativo secundário com a abertura dos canais iônicos de  $\text{Ca}^{+2}$ , ativando respostas bioquímicas na membrana acrossomal, principalmente na ativação da via do cAMP (GADELA et al., 2001).

## 11 CONCLUSÃO

### 11.1 EXPERIMENTO I – Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma potencial tecnologia para indução da RA *in vitro* de espermatozoides bovino.

O biossensibilizador ALA apresenta uma resposta fisiológica, muito forte na presença da luz visível, em ambos os sistemas biológicos estudados no presente experimento, sendo necessário verificar a melhor concentração de uso.

Ao avaliar os estudos de TFD associado ao fotossensibilizador ALA na fase de clivagem (D3) e na fase de blastocisto (D7), inferimos que há a necessidade de mais estudos para ajustar a dose do ALA.

### 11.2 EXPERIMENTO II – Heparina

A heparina é um bom indutor de reação acrossomal para espermatozoide bovino, analisado na produção *in vitro* de embriões. Todavia demonstrou que para sêmen congelado de raça zebuína, a capacitação espermática e consequente reação acrossomal independe da utilização e ou a concentração de heparina.

Não há efeito das diferentes concentrações de heparina quando utilizado sêmen congelado e seleção por percoll sobre a taxa de clivagem (D3) e o percentual de embrião (D7).

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R.; WALTER, P. **Organização interna da célula: Estrutura da membrana.** In: \_\_\_\_\_. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 583-595, 2004.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G., H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C., J., H.; SIBATA, C., H. **Photosensitizers in clinical PDT.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, n. 1, p. 27 – 42, 2004.

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

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. **Spermatozoal function.** In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger. Cap. 80, p. 717-718, 1992.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

AX, R.L.; LENZ, R.W. **Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls.** *Journal of Dairy Science*, v.70, n.7, p.1477-1486, 1986.

BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIME, S. **Photodynamic Therapy in Dermatology – an update.** *Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine*, v. 21, p. 142 – 149, 2005.

BALL, B. A.; VO, A. **Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591.** *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.

BAGNATO, V., S. **Os fundamentos da luz laser.** *Física na Escola*, v.2, n.2, p. 4-9, 2001.

BAGNATO, V., S. **Novas técnicas óticas,** Livraria da Física, São Paulo, Brazil, 2008.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A. et al. **Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa**. *Theriogenology*, v. 60, n. 7, p. 1239-1247, 2003.

BAZER, F.W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. **Fertilização, clivagem e implantação**. In: **HAFEZ, E. S. E.** Reprodução Animal. 6. ed. São Paulo: Manole, Cap. 8, p. 191-193, 1995.

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

BONNETT, R. **Photosensitizers of porphyrin and phtalocyanine series for photodynamic therapy**. *Chemical Society*, v.24, p.19-33, 1995.

CASTANO, A.P; DEMIDOVA, T., N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 279 – 293, 2004.

CALZAVARA, P.G.P.; VENTURINI, M.; SALA, R. **Photodynamic Therapy: Photochemistry and Photobiology**. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, p. 293-302, 2007.

CHAN JZ, KRAUSE W, BOHRING C. **Computer-assisted analysis of sperm morphology with the aid of lectin staining**. *Andrologia*, v.34, p.379-383, 2002.

CHENG FP, FAZELI A, VOORHOUT WF, MARKS A, BEVERS MM, COLENBRANDER B. **Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa**. *Journal Andrologia*, v.17, p.674-682, 1996.

COLENBRANDER, B. **Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm**. *Theriogenology*, v.58, p.341-345, 2002.

COLL, J. **La Terapia Láser**, hay. 3.ed. São Paulo-SP: Editora CDL, 1987.

CORMIER, N.; BAILEY, J., L. **A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa**. *Biology Reproduction*, v.69, p.177-185, 2003.

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

CROSS, N., L.; WATSON, S., K.; **Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins.** *Theriogenology*, v.42, p.89-98, 1994.

CROSS, N., L. **Role of cholesterol in sperm capacitation.** *Biology Reproduction*, v. 59, p. 7 – 11, 1998.

CUNEO, M., F.; VICENTI, L., M.; MARTINI, A., C.; PONCE, A., A.; RUIZ, R., D. **Effects of PDC – 1-9 on sperm functional activity in presence or absence of heparin.** *Theriogenology* v. 62, p. 207 – 216, 2004.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISSA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. **Sperm chromatin structure and male fertility:** biological and clinical aspects. *Asian Journal Andrology*, v.8, p.11-29, 2006.

DELPECH, S.; THIBAUT, C. **Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation.** In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. *Reproduction in mammals and man.* Paris: Ellipses, Cap. 14, p. 268-278, 1993.

DOUGHERTY, T., J.; GOMER, C., L; HENDERSON, B., W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOA, J.; PENG, Q. **Photodynamic Therapy.** *Journal of The National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889 – 905, 1998.

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

FAZELI, A.; HAGE, W., G.; CHENG, F., P.; VOORHOUT, W., F.; MARKS, A.; BEVERS, M., M.; COLENBRANDER, B. **Acrosome intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pelucida in vitro.** *Biology Reproduction*, v.56, p.430-438, 1997.

FENNYO, M. **Theoretic and experimental basis of biostimulation by laser irradiation.** *Optics laser technology*, v 8, p. 209, 1984.

FLESCHE, F., M.; VOORHOUT, W., F.; COLENBRANDER, B.; VAN, G., L., M., G.; GADELLA, B., M. **Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa:** A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biology Reproduction*, v.59, p.1530-1539, 1998.

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

FUKUDA, H.; CAJAS, A.; BATLLE, A. Aminolevulinic acid: From its unique biology function to its star role in photodynamic therapy. *The International Journal of Biochemistry e cell Biology*, v. 37, p. 272 – 276, 2005.

FUKUI, Y.; SONOYAMA, T.; MOCHIZUKI, H.; ONO, H. **Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro**. *Theriogenology*, v.34, n.3, p.579-591, 1990.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. **Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm**. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.249-265, 2001.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. **Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview**. In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003. Anais... Brewster – Massachusetts: p. 43-48, 2003.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. **Espermatozóides e plasma seminal**. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.) *Reprodução animal*. 6. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, p. 167-190, 1995.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. **Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide**. *Biology Reproduction*, v.53, p.276-284, 1995.

GILLIAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential**. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.

GIROTTI, A. W. **Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways**. *Cytotoxic effects and Photobiology B: Biology*, v. 63, p. 103 – 113, 2001.

GONÇALVES, P., B., D.; BARRETA, M., H.; SANDRI, L., R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A., Q. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte**. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.31, p.212-217, 2007.

GRAHAM, J.K , **Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach**, *Animal Reproduction Science* 68, 239–247, 2001

GRAHAM, J.K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R.H. **Analysis of Sperm Cell Viability, Acrosomal Integrity, and Mitochondrial Function Using Flow Cytometry**, *Biology of Reproduction* 43, 55-64, 1990.

GWATHMEY, T., M.; IGNOTZ, G., G.; MUELLER, J., L. **Bovine seminal plasma proteins PDC – 109, BSP A, and BSP – 30 – Kda share functional roles in storing sperm in the oviduct**. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 501 – 507, 2006.

HAFEZ, E. S. E. **Preservação e criopreservação de gametas e embriões**. In: \_\_\_\_\_. *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, Cap. 24, p. 513-535, 1995.

HARRIS, D. M. **Laser biostimulation, review and hypothesis**. *Laser topics*, v. 10, n. 3, p. 9-19, 1988.

HOLLINSHEAD, F., K.; O'BRIEN, J., K.; MAXWELL, W., M., C.; EVANS, G. **Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa**. *Theriogenology*, v.62, p.958-968, 2004.

IAFFALDANO N., ROSATO M.P., PAVENTI G., PIZZUTO R., GAMBACORTA M., MANCHISI A., PASSARELLA S. **The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents there in vitro liquid storage dependent damage**. *Animal Reproduction Science*, 119 (1-2), p. 123-129, 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. **Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility**. *Veterinary Zootech*, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

KALKA K, MERK H, MUKHTAR H. **Photodynamic therapy in dermatology**. *Journal of Academic Dermatology*. v. 42, p. 389-413; quiz 414-6, 2000.

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

KARU, T.I. **Photobiological regulation of cellular metabolism with low intensity visible light I**. *SRCTL*, 7, p.1, 1985a.

KARU, T. **Photobiochemistry of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light II**. *SRCTL*, 8, p.1, 1985b.



KARU, T.; PYATIBRAT,L.; KALENDO, G. **Inrradiation With He-Ne Laser Increases ATP level in cells cultivated *in vitro***. Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 27, p. 219 – 223, 1995.

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

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

KENNEDY, J., C.; POTTER, R., H.; PROSS, R., H. **Photodynamic therapy with endogenous photoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience**. Journal os Photochemistry and Photobiology B: Biology, n. 6, p. 143 – 148, 1990.

KESSEL, D. **Photodynamic therapy: from The beginning**. Photodyagnosis and Photodynamic therapy, v1, p. 3-7, 2004.

KITIYANANT, Y.; CHAISALEE, B.; PAVASUTHIPAISIT, K. **Evaluation of the acrossome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187**. Int Journal Andrology, v.25, p.215-222, 2002.

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

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

KOHL, E.; KARRER, S. **Photodynamic therapy for photorejuvenation and nononcologic indications: Overview**, v. 146, n. 6, p. 473-485, 2011.

KURWA HA, BARLOW RJ. **The role of photodynamic therapy in dermatology**. Clinical Dermatology.; v.2, p. 143-151, 1999.

KRUPKA A. K., CZUBA Z., SZLISZKA E., KROL W., SIERON A. **The role of photosensitized macrophages in photodynamic therapy**, Oncology Reports v.26, p.275-280, 2011.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. **Reactive oxygen species and sperm physiology**. *Reviews of Reproduction*, n. 2, p. 48-54, 1997.

LAVIR, ANKRI, R.; SINYAKOU, M.; EICHLER, M.; FRIEDMANN, H.; SHAINBER, G., A.; BREITBART, H.; LUBART, R. **The plasma membrane is involved in the visible light. Tissue Interaction**. *Photomedicine laser surgery*, DOI: 10-1089/ phD 3-83, 2011.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LAVIE, R. **Photobiostimulation as a function of different wavelengths**. *Laser Therapy*. v. 12, p. 38 -41, 2000.

LUCRAY, M., D.; EDWARDS, B., F.; MADEWELL, B., R. **Veterinary photodynamic therapy**. *Veterinary Medicine Today: Reference Point*, v. 216, n. 11, p. 1745 – 1751, 2000.

LUCRAY, M., D. **Photodynamic therapy for companion animals with cancer**. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 32, n.3, p. 693 – 702, 2002.

MANJUNATH P, THERIEN I. **Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation**. *Journal Reproduction Immunology*, v.53, p.109-119, 2002.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. **Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk**. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

MAGARGEE, S., F.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R., H. **Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation**. *Biology Reproduction*, v.38, p.667-685, 1988.

MASTER, E. **Mester's Method of laser biostimulation**. In: INTERNATIONAL CONGRESS OPTOELETRONICIN MED BULIN – D. 7., 1983. Springer... Verlag: Waidelinch, p.103, 1983.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. **Reste hiposmótico na avaliação de sêmen equino**. *Arquivo Brasileiro de veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 71-78, 1999.

MORTINER, S.T.; SCHEVAERT, D.; SWAN, W.A.; MORTINER, D. **Quantitative observations of flagella motility of capacitating human spermatozoa**. *Human Reproduction*, v.12, p.1006-1012, 1997.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E., K.; GADELLA., B., M. **A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrossome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of eggolk particles.** Biology Reproduction, v.68, p.1828-1835,2003.

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

OULARAMARA, A. **Biological activitymeasurements on botanical specimen surfaas using temporal decorelation effect of laser speckle.** Journal modern options, v. 36, p. 165, 1989.

OZDEMIR, F., J.; BIRTARE, M.; KOKINO, S. **The clinical efficacy of low – power laser therapy on pain and function in cervical osteoarthritis.** Clinical Rheumalology, v. 20, n. 3, p. 181 – 184, 2001.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIEDRUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. **Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen.** Theriogenology, v.25, n.4, p.591-600, 1986.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. ***In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium.** Theriogenology, v.51, p.461472, 1989.

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

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J., M. **Correlation of sub cellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features aftir photodynamic therapy.** Ultrastructural Pathology, v20, p. 109 – 129. 1996.

PEPLOW, P., V.; CHUNG, T., Y.; BAXER, G., D. **laser photobiomedicine of proliferation os cels in culture: a review of humanan and animal studies.** Photomedicine and laser surgery. v. 28, n. 1, p. 530-540, 2010.

PERUSSI, J., R. **Inativação fotodinâmica de microrganismos.** Revista Química Nova, v.30, n 4, p. 988 - 994, 2007.

PONTINEN, P. **Low level laser therapy as a medical treatment modality.** Tampere – Finland: Editora Art Urpo, 1992.

RAFF, M. **Cell suicide for beginners.** Nature, v 396, n. 6707, p. 119-122, 1998.

RICCI, R. **Biomodulação em células endoteliais com dosimetrias diferentes do laser de baixa potência arsenito de ídrio galio.** 30f. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biométrica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

ROCHA-JÚNIOR, A., M.; VIEIRA, B., J.; DE ANDRADE, L., C., F.; ARESTRUP, F., M. **Effect of low-level therapy on the progresso of wound humans: The contribution of *in vitro* experimental studies.** Journal Vascular Brasileiro, v.6, n.3, p. 258-266, 2007.

RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, “**Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches,**” in **Topics in Bull Fertility**, P. J. Chenoweth, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY, USA, Ed., pp. 502–600, 2000.

SENGER, P. L. **Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation e fertilization.** In: Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. Moscow: Current Conceptions, Cap. 12, p. 266-283, 2003.

STELL, A., J.; DOBSON, J., M.; LANGMADL, K. **Photodynamic therapy of feline superficial squamous cele carcinoma using topical 5-aminolaerulinic acid.** Journal of Small Animal Prattice, v. 42, n.4, p. 164 – 169, 2001.

SUZUKI, K., GESHI, M., YAMAGUCHI, N.; NAGAI, T. **Functional changes and motility characteristics of japanese black bull spermatozoa separated by percoll.** Animal Reproduction Sci, v.77, p.157-172, 2003.

SIRIVAIIDYAPONG S, CHENG FP, MARKS A, VOORHOUT WF, BEVERS MM, COLENBRANDER B. **Effect of sperm diluents on the acrossome reaction in canine sperm.** Theriogenology, v.53, p.789-802, 2000.

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

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. **Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation.** Human Reproduction 19,611–615, 2004.

TESARIK, J.; **Paternal effect on cell division in human preimplantation embryo.** Reproductive Biomedicine online, v. 10, n.3, p. 370 – 375, 2005.

TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; GUZZARDELLA, G. A.; MORRONE, G.; CARPI, A.; GIARDINO, R. **Laser biostimulation of cartilage: *in vitro* evaluation.** Biomedecine & Pharmacotherapy, v.55, n.2, p.117-120, 2001.

VELEZ, M.; COLL, J. **Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, em especial El laser de baja potencia,** CDL, V.15-16, P. 6 – 21, 1988.

WILSON, P. **Photosensitizing compounds:** Their chemistry, Biology and clinical use wiley interscience: Chichister, p73, 1989.

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

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. **Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures.** Molecular Reproduction and Development, v.34, n.1, p.94-100, 1993.

ZANCALENA, D. C. **Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos.** Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis 2009 dissertação USP

## ANEXO I



Educação e Responsabilidade Social

**Comitê de Ética em Experimentação Animal**

André Belico de Vasconcelos

Ofício CEEA-069/2014

Uberaba, 27 de fevereiro de 2015

Ilmo. Prof.

Assunto: Encaminha parecer do processo nº 015/2014, sobre o protocolo de Pesquisa "O efeito da terapia fotodinâmica na produção in vitro de embriões bovino"

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à reavaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 07/10/2014, sendo considerado aprovado.

Atenciosamente,

**Prof. Joely F. Figueiredo Bittar**  
Coordenadora do CEEA-UNIUBE