ADRIANO FELIPE PEREZ SIQUEIRA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA E A
PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
BOVINOS**

SÃO PAULO

2011

ADRIANO FELIPE PEREZ SIQUEIRA

**Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade
espermática e a produção *in vitro* de embriões bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

**São Paulo
2011**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2510
FMVZ

Siqueira, Adriano Felipe Perez

Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a
produção *in vitro* de embriões bovinos / Adriano Felipe Perez Siqueira. -- 2011.
124 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

1. Fotobioestimulação. 2. Laser He-Ne. 3. Citometria de fluxo. 4.
Espermatozoides. 5. Fecundação *in vitro*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a produção *in vitro* de embriões bovinos”, utilizando material biológico: doses de sêmen congelado de touros de centrais de reprodução e ovários de animais destinados ao abate comercial, ou seja resíduos descartados no processo de abate comercial, protocolado sob o nº1688/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Mayra Elena Ortiz D’Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/07/09.

We certify that the Research “Low power laser effect on sperm viability and bovine embryo *in vitro* production”, protocol number 1688/2009, under the responsibility Profa Dra Mayra Elena Ortiz D’Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 07/01/09.

São Paulo, 13 de julho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Alice D. Lobo
Médica Veterinária
CRMV 45103

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SIQUEIRA, Adriano Felipe Perez

Título: Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mario Binelli

FMVZ/USP

Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Chefe do Centro de Pesquisas em Andrologia do Departamento Cirurgia, Setor integrado Reprodução Humana/ UNIFESP

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

FMVZ/USP

Ao Deus Criador, aos meus pais, à
minha família, aos meus amigos,
ao querido Simon, pelo apoio,
carinho e amor incondicional!

Agradecimentos

Esta parte promete ser longa, o que me faz ter mais motivos a agradecer!

À minha mãe, **Terezinha**, ao pai, **Siqueira** e ao meu irmão, **André**, por me apoiar ao longo destes anos, por vibrar e se orgulhar de minhas conquistas, por incentivar minhas aspirações. À minha mãe em especial, sempre disposta e preocupada em ajudar, pelos mimos e lanchinhos sempre muito carinhosos. Ao **Simon** pela companhia, por ser sempre o primeiro a me receber com felicidade independente da hora que eu chegasse.

À minha **família** por entender minha ausência quando necessária, pelo apoio quando necessário e por estar presente nos momentos importantes.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
Ao Departamento de Reprodução Animal, representado pelo chefe professor Pietro Sampaio Baruselli, por me acolher nestes quase sete longos anos de muitas gargalhadas e estripulias.

Ao Programa de Pós Graduação que me acolheu, representados pelo professor Marcelo e Harumi por me ajudarem com as partes burocráticas.

À professora Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, minha orientadora, por todo carinho e preocupação, por sempre sacrificar suas madrugadas e momentos com os meninos (Xi e João, obrigado por dividir a atenção e o tempo) quando os prazos eram apertados. Por dividir sua vaga no estacionamento (rsssss) e a guarda compartilhada do MAC. Pelo incentivo e pela confiança depositada em mim. Confirmando seu dedo podre em escolher os orientados, todos TOTALLY CRAZY, mas juntos quase uma família normal!
OBRIGADUUUUUU....

Ao professor Mário Binelli, primeiro orientador, que acreditou no meu potencial – mesmo desastrado – despertou minha fascinação pela pesquisa e possibilitou que hoje este momento fosse possível e me apóia e ajuda sempre que preciso...

Ao professor José Antônio Visinin, por ter me adotado na ausência da Mayra, pelas dicas tão pertinentes, por permitir e me acolher em seu grupo.

Aos colegas de Laboratório Thomitas (Giassetti), Fê pelo companheirismo e diversão no LAB, pela fiel parceria nas baladas....me acolherem nas noites de ESQUILOS ATIVAR, por serem minhas mãos extras, por dias de incubação no escuro hauaha (Fê horas de vôo no citômetro...), pelos mimos, pelas roupas extras (mesmo quando o tamanho era menor né Thomitas!!).

A Júlia (Julietaaaa) pela amizade sincera...desde as caronas, as aventuras, por trazer a maça (vai Evaaaaa!!)...por estar sempre preocupada comigo, por ser meio confidente e conselheira.

Thaís pela volta ao mundo completada em corridas do SAS, pela preocupação e disposição.

Flávia (ou Flavííia) pelos conselhos em assuntos aleatórios, exemplo de dedicação, sempre muito aplicada e íntegra...ahhh não poderia esquecer dos lanches do Mc e dos momentos WII.

A Camilla (Camis) pelas idéias, pela disposição, por toda ajuda, além dos bolos, omeletes, drinks....hauahauhau

À Rafaela (Rafaídia de Jesus), ao Pedro (Pedríííinho) pelas dias musicais no fluxo, pelos meios divididos (hauahaua) e por toda amizade e agradável convivência!!

Ao Zeca, Robinson, Samir, Everton, Jéssica pelos divertidos momentos em nossa aconchegante salinha de estudos...pela convivência e muitos momentos de risada.

Aos ICS do laboratório Giana, Érica, Alexandre, Mariana, Thais (uma das duas que eu não consigo acertar o nome!!). Em especial à Xum por todos os compartilhamentos de comida ("Me dá um peda?"), pelo alto astral e exemplo de superação. A Letícia (por quase perder todas as minhas palhetas e destruir o laboratório comigo... mas pelo menos você dividiu os urubus....)

Aos estagiários que passaram durante estes anos, sempre interessados e dispostos a ajudar, Mariana Gurgel, Marcos, Letícia, Jonathan, Andrez, Livia e todos os outros

Aos que não estão mais aqui... Paulo, Rê, Groke, Alê, Febem, Marcinha, Doci, Alberto que participaram em algum momento desta minha jornada, alguns bem anteriores a mim e que incentivaram meu interesse pela pesquisa.

A Marcella (Coooooooo) e Fabíola, pelas idéias e trabalhos loucos com a luz Jedai (é assim que escreve?), por empenhar-se em ajudar nos obstáculos surgidos ao longo desta aventura, pelo interesse e dedicação! Ao Thiago e Taciana pelas assistências em Física, pela ajuda com o laser e pela ponte ABC-USP.

A Professora Valquíria, Professor Renato, Marcílio, Andressa, Paola, João Diego, Roberta, Rodrigo, Eduardo, Mariana, Daniele do LA, pelo empréstimo do CASA, pelos dias disponíveis e pelos almoços corridos nos dias de amostras (né Andressa?). Em especial ao Marcílio pela assistência estatística também sempre disponível e preocupado, membro cativo das discussões SAS...e amigo da família VRA.

Falando em Família VRA A todos os funcionários do VRA, em especial a Dona Sílvia e a Dona Sandra, as primeiras que eu encontro após uma longa madrugada de trabalho, sempre receptivas e carinhosas, e ao Miguel exemplo de organização e cortesia.

Aos alunos da Pós, pela convivência, pelos churrascos animados, em especial a Camila e suas meninas e menino, Liege, Cris, Loira, Déniel, Gi e ICs. Ao Peixe-Boi, a Lili, a Manu, a Jú, a Cínthia, a Saara, Manolo, Lindsay, Zé, Henderson, Júlia, Robertinha.

Aos demais professores do VRA em especial a Claudinha, Simprão, Ricardo, Carlinha.

Kustela (Jú, tia e tio agregados), Keiloka, Fusketa, Ralé, amigos eternos desde o início da vida veterinária, sempre preocupados mesmo após a formatura sententiniana, falando em Setenta, a todos os setentianos queridos sempre muito lembrados.....

Ao pessoal da UNIFESP, Paulinha, Thiesa, Bobes e Snarf pelos momentos divertidos e amizade eterna....as diversões nos Japas e Karaokês da vida...

Aos amigos Henrique e Marcelo (não-vets), mas não menos importantes que mesmo de longe ou “MUITO LONGE” sempre torcem pelo meu sucesso.

É o Créu do Adriano...

É créu!
É créu neles!
É créu!
É créu no Laser!
"Vambora, que vamo!"
"Vambora, que vamo!"

Prá fazer mestrado
Tem que ter disposição
Prá fazer mestrado
Tem que ter habilidade
Pois essa fase
Ela não é mole não
Eu venho te lembrar
Que tem que ter capacidade

Prá fazer embrião
Tem que ter concentração
Prá fazer FIV
Tem que ter motilidade
Pois essa dança
Ela não é mole não
Citômetro, TUNEL e integridade
Eu venho te lembrar
Que para defender são 5 dificuldades...

A primeira é devagarzinho
Só o aprendizado. (De física!!!)
É assim, oh! Fluência?? Fluência?! Fluência!!!
Se ligou? De novo! Fluência!!! Alinhamento!!! Angulosidade!!!

Número 2!
Citômetro!! SCSA, FITC-PSA – PI, JC1
Continua fácil, né?
É, mais no final não deu concentração!!

Faz tudo de novo!
SCSA, FITC-PSA – PI, JC1 Créu, créu, créu!
Número 3!
MIV, FIV, CIV, créu! (Todas no mesmo dia!!)
Tá ficando difícil, hein?
MIV, FIV, CIV, créu!

Agora eu quero ver a 4!
TUNEL, TUNEL, TUNEL,
Até as duas da manhã?? Que isso??
Tá aumentando mané!

Segura DJ! (Mayra, Marcílio, Rodrigo, Flávia, Thaís e Mário)

Vou confessar a vocês
Que eu não consigo
Essa tal de ESTATÍSTICA!!

A número 5

DJ! Velocidade $p < 0,005$

Na dança do créu!!

É o SAS, SAS, SAS, SAS, SAS, SAAAAAAAAS

Hahahahaha

PROC-teste-pós teste-Rodou??-Rodou??...

Prá fazer mestrado
Tem que ter disposição
Prá fazer mestrado
Tem que ter habilidade
Pois essa fase
Ela não é mole não
Eu venho te lembrar
Que tem que ter capacidade

É assim, oh! Créeeeu...

Sugestão: Mayra

Realização: www.vraneurótico.br

‘Um laboratório grandes amigos, uma equipe’

Chego à conclusão que o não saber é uma
DÁDIVA, que nos permite desfrutar a
FANTÁSTICA experiência do
APRENDER!

(Eu mesmo, mas alguém já deve ter percebido isso antes).

RESUMO

SIQUEIRA, A. F. P. **Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a produção *in vitro* de embriões bovinos.** [Effect of low-power laser on sperm viability and in vitro production of bovine embryos], 2011. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O sucesso da fecundação e da sustentação do desenvolvimento embrionário subsequente é dependente de atributos espermáticos relacionados à qualidade seminal. A produção *in vitro* de embriões em bovinos é uma ferramenta fundamental para a aceleração do ganho genético do rebanho, porém o uso comercial depende diretamente da melhoria do sistema de produções *in vitro* de embriões a um baixo custo. Técnicas que proporcionem melhoria da qualidade seminal possibilitando um incremento na produção *in vitro* de embriões e ainda a um baixo custo possuem apelo econômico. O laser de baixa potência emite ondas eletromagnéticas com efeitos biológicos. Este efeito é dependente dos parâmetros de irradiação e do tipo celular alvo. Trabalhos avaliando o laser de baixa potência em amostras seminais sugerem que seja utilizado para melhorar os atributos espermáticos e, conseqüentemente, a produção *in vitro* de embriões. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e averiguar o efeito desta estimulação na produção *in vitro* de embriões bovinos. Para isso, amostras comerciais de sêmen criopreservado foram descongeladas e submetidas à irradiação com laser He-NE. No experimento 1 foram testadas as potências de 0; 5; 7,5 e 10mW, por 5 ou 10 minutos de tratamento. As amostras de sêmen foram avaliadas imediatamente após a irradiação e após 30 minutos de incubação. Foram verificadas possíveis interações duplas (Potência*Duração do Tratamento, Potência*Tempo e Duração do Tratamento*Tempo) e tripla (Potência*Duração do Tratamento*Tempo). No experimento 2 foi avaliado o efeito da melhor combinação potência X duração dos tratamentos utilizados no Experimento 1, para irradiar o sêmen utilizado para a produção *in vitro* de embriões. O laser de baixa potência apresentou efeito sobre diversos atributos relacionados à viabilidade espermática. Este efeito foi dependente da potência e da duração do tratamento. Nas condições experimentais, a potência de 5mW com duração de 10 minutos de aplicação sugere efeitos positivos no aumento na viabilidade espermática. No entanto, o

tratamento de espermatozóides nesta potência e duração do tratamento, não apresenta incremento nas taxas de produção nem na qualidade embrionária.

Palavras chave - Fotobioestimulação, LASER He-Ne, Citometria de fluxo, espermatozóide, fecundação *in vitro*

ABSTRACT

SIQUEIRA, A. F. P. **Effect of low potency laser on sperm viability and *in vitro* production of bovine embryos.** 2011. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Success of fertilization and the maintenance of subsequent embryo development rely on sperm attributes related to seminal quality. The *in vitro* production of bovine embryos is an essential tool for genetic gain in the herd. However, its commercial use directly depends on improvement of the production system at a low cost. Inexpensive techniques which provide an increase of seminal quality, allowing the increment of *in vitro* production of embryos are of great interest to cattle breeding. Low-power laser emits electromagnetic waves with biological effects. These effects are dependent of irradiation parameters and target cell type. Studies with seminal samples irradiated by low potency laser suggest its use to improve several sperm features and, therefore, *in vitro* production of embryos. This study aimed to evaluate the effect of low potency laser on sperm viability and fertilization ability of irradiated sperm. Briefly, in Experiment 1, samples of frozen/thawed commercial semen were subjected to He-NE laser irradiation. Laser potencies of 0, 5, 7.5 or 10mW were tested for 5 or 10 min of treatment. Samples were evaluated immediately and 30 min after irradiation. Double (Potency*Treatment length, Potency*Time and Treatment length*Time) and triple interactions (Potency*Treatment length*Time) were assessed. Afterwards, in Experiment 2, the effect of the best combination of potency and exposure length on *in vitro* production of embryos was verified. Low potency laser affected several semen attributes related to sperm viability. This effect was dependent on laser potency and the length of treatment. In the experimental conditions tested in this study, 5mW potency combined to 10 min of exposure had appeared to have positive effect of increasing sperm viability. However, 5mW potency laser for 10 min sperm irradiation did not improve *in vitro* embryo production rates and bovine embryo quality.

Keywords - photobiostimulation, He-Ne LASER, flow cytometry, spermatozoa, *in vitro* fertilization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotografia do sistema óptico em ambiente iluminado; B: Fotografia do sistema óptico em ambiente escuro – São Paulo – 2011 50
- Figura 2** Análise da homogeneidade da distribuição das ondas eletromagnéticas no campo de irradiação. A e B fotografia do campo de irradiação. C, D, E e F gráfico 3D da distribuição de pixels – São Paulo 2011 51
- Figura 3** Gráficos da análise pelo software FlowJo v8.7 para a análise da associação de sondas FITC-PSA/PI. A: histograma da fluorescência verde; B: histograma da fluorescência vermelha; C: gráfico das fluorescências verde/vermelha, no qual estão representadas as quatro populações e respectivas porcentagens - São Paulo – 2011 54
- Figura 4** Gráficos das amostras coradas com JC-1 analisados no citômetro de fluxo. A: populações de alto e baixo potencial bem definidas; B: populações de potencial intermediário e baixo bem definidas; C: população de baixo potencial bem definida e populações de potencial intermediário e alto distribuídas gradualmente - São Paulo, 2011 56
- Figura 5** Gráficos do ensaio SCSA. A: controle negativo; B: controle positivo; C mistura 1:1 controle positivo/controle negativo - São Paulo, 2011 57
- Figura 6** Microscopia de epifluorescência do ensaio cometa alcalino (aumento de 200X coloração sonda fluorescente Syber Green). A: espermatozóides com DNA íntegro (ausência de cauda e cabeça

intensa); B: espermatozóides com fragmentação discreta (presença de cauda discreta e cabeça intensa); C: espermatozóides com fragmentação moderada (presença de cauda expressiva e cabeça com intensidade moderada) D: espermatozóides com fragmentação elevada (presença de cauda expressiva, e cabeça com baixa intensidade) - São Paulo, 2011

88

Figura 7 Imagem ilustrativa dos parâmetros quantificados pelo software Comet Score™.

88

Figura 8 Imagem de microscopia de epifluorescência submetida a quantificação no software Comet Score™.

89

Figura 9 Microscopia de epifluorescência de embriões submetidos ao ensaio TUNEL. A: Controle Negativo (filtro DAPI); B: Controle Negativo (filtro FITC); C: Controle Positivo (filtro DAPI); D: Controle Positivo (filtro FITC); E: Embrião analisado (filtro DAPI); E: Embrião analisado (filtro FITC) - São Paulo, 2011

94

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da motilidade visual para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo, 2011	66
Gráfico 2	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) do vigor para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo, 2011	67
Gráfico 3	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da aglutinação para efeito duração - São Paulo, 2011	67
Gráfico 4	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da motilidade progressiva para interação Potência*Duração. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento de 5 minutos; d10 duração de tratamento de 10 mnutos - São Paulo, 2011	68
Gráfico 5	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) para efeito duração do tratamento - São Paulo, 2011	69
Gráfico 6	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) para efeito Tempo - São Paulo, 2011	69

Gráfico 7	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da amplitude de deslocamento lateral da cabeça para efeito pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo, 2011	70
Gráfico 8	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade de trajeto média (VAP) para interação Potência*Duração de tartamento p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7,5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo, 2011	70
Gráfico 9	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade linear progressiva (VSL) para interação Potência*Duração p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo, 2011	71
Gráfico 10	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade de curvilínea (VCL) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; FINAL – tempo de análise FINAL - São Paulo, 2011	72
Gráfico 11	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade curvilínea (VCL) para interação Potência*Duração do tratamento. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo, 2011	72

Gráfico 12	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da alongação das células (Elong) para efeito duração - São Paulo, 2011	73
Gráfico 13	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da alongação das células (Elong) para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo, 2011	74
Gráfico 14	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da lesão de membrana plasmática (PL) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; FINAL – tempo de análise FINAL - São Paulo, 2011	74
Gráfico 15	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da integridade de membrana plasmática (PI) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; FINAL – tempo de análise FINAL - São Paulo, 2011	75
Gráfico 16	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da lesão de acrossomo (AL) para efeito duração - São Paulo, 2011	75
Gráfico 17	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da integridade de acrossomo (AI) para efeito duração - São Paulo, 2011	76
Gráfico 18	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das membranas acrossomal e plasmática lesadas (ALPL) para efeito duração - São Paulo, 2011	76
Gráfico 19	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIPI)	

	para efeito duração - São Paulo, 2011	77
Gráfico 20	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com alto potencial de membrana mitocondrial (Alto) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; FINAL – tempo de análise FINAL - São Paulo, 2011	77
Gráfico 21	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com alto potencial de membrana mitocondrial (Alto) para interação Potência*Duração do tratamento. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo, 2011	78
Gráfico 22	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (Intermediário) para interação Potência*Duração. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo, 2011	79
Gráfico 23	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das células positivas do ensaio da estrutura da cromatina (SCSA positivo) para efeito Duração do tratamento - São Paulo, 2011	79
Gráfico 24	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das células negativas do ensaio da estrutura da cromatina (SCSA negativo) para efeito Duração do tratamento - São Paulo, 2011	80

Gráfico 25 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 0 mW nas durações do tratamento de 5 e 10 minutos para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo, 2011

80

Gráfico 26 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 5 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo, 2011

81

Gráfico 27 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 7,5 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo, 2011

81

Gráfico 28 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 10 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população

com potencial de membrana mitocondrial intermediário
(inter) - São Paulo, 2011 82

Gráfico 29 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 0 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo, 2011 82

Gráfico 30 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 5 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo, 2011 83

Gráfico 31 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 7,5 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo, 2011 83

Gráfico 32 Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 10 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo, 2011 83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Potência, duração do tratamento e fluência dos grupos tratamento e controle - São Paulo - 2011	48
Quadro 2	Concentração espermática, concentração e volume das sondas fluorescentes, tempo e temperatura de incubação no preparo das amostras para a leitura no citômetro de fluxo - São Paulo - 2011	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valor de p do efeito, da potência, da duração do tratamento e do momento de análise, assim como as interações dos efeitos para cada variável estudada - São Paulo, 2011	65
Tabela 2	Valores de P para os efeitos tratamento, tempo e tratamento*tempo para os parâmetros espermáticos analisados - São Paulo, 2011	84
Tabela 3	Médias e erro padrão da média ($\pm$ EPM) dos grupos tratado e controle, nos atributos espermáticos analisados e respectivos valores de P para o efeito de tratamento - São Paulo, 2011	85
Tabela 4	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) dos três momentos de análise e valor de P para efeito tempo - São Paulo, 2011	86
Tabela 5	Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) do grupo tratado e controle nos três momentos de análise e o valor de P para a interação Tratamento*Tempo - São Paulo, 2011	87
Tabela 6	Valores de P para os efeitos tratamento, tempo e tratamento*tempo para os parâmetros do ensaio cometa alcalino - São Paulo, 2011	89
Tabela 7	Média $\pm$ EPM do grupo tratado e controle para o ensaio cometa alcalino e valores de P para o efeito de tratamento - São Paulo, 2011 - São Paulo, 2011	90

Tabela 8	Média $\pm$ EPM dos momentos de análise do ensaio cometa alcalino e valor de P para o efeito de tempo - São Paulo, 2011	91
Tabela 9	Médias $\pm$ EPM dos grupos tratado e controle, nos três momentos de análise (T0, T10 e T30) e valores de P para a interação Tratamento*Tempo - São Paulo, 2011	92
Tabela 10	Médias $\pm$ EPM das taxas de produção <i>in vitro</i> de embriões dos grupos tratado (laser), controle e o valor de P - São Paulo, 2011	93
Tabela 11	Médias $\pm$ EPM das avaliações embrionárias e o valor de P - São Paulo, 2011	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+++	Três cruzes
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
3D	Tridimensional
AI	Acrossomo íntegro
AL	Acrossomo lesado
AlfaTYlog	É o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela Fluorescência total (vermelho + verde) da cromatina de cada espermatozóide.
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça em micrometros
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosil trifosfato
BCF	Frequência de batida cruzada
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CCO	Complexos <i>cumulus oophorus</i>
CD46	<i>Cluster of differentiation 46</i>
Cels	Células
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
CPCs	Centrais de Processamento e Colheita de Sêmen
DABCO	<i>1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dUTP	<i>Deoxynucleotidyl transferase mediated</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPM	Erro padrão da média

EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC-PSA	<i>Psium sativum</i> conjugada ao fluoróforo isotiocionato de fluoresceína
FIV	Fecundação in vitro
g	Gramma
g	Força centrífuga
G	Gauge
GaAIAs	<i>Gallium aluminium arsenide</i>
GaAs	<i>Gallium arsenide</i>
h	Hora
He-Ne	<i>Helium néon</i>
Hoechst 33342	<i>Trihydrochloride, trihydrate</i>
ICSI	Injeção intra-citoplasmática de espermatozóides
IP	Iodeto de propídio
J	Jaule <i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'</i>
JC-1	<i>tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
K	Potássio
l	Levógiro
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emissions of Radiation</i>
LIN	Linearidade
LM	Low melting
mA	Miliampere
Min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mW	Miliwatt
n	Número
Na	Sódio
NADH	Dinucleotideo de nicotinamida e adenina
Nd:YAG	<i>Neodymium: yttrium aluminium garnet</i>

nm	Nanômetro
NM	Normal melting
°C	Graus celsius
P	P valor
PBS	Solução salina fosfatada
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Membrana plasmática íntegra
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PL	Membrana plasmática lesada
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
s	Segundo
SAS	Statistic analysis system
SCSA	Sperm chromatin struture assay
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Synthetic oviduct fluid
STR	Retidão
T0	Tempo zero
T10	Tempo 10
T30	Tempo 30
TALP	<i>Modified tyrode's albumin lactate pyruvate</i>
TCM	<i>Tissue culture medium</i>
TBE	<i>Tris-boric-EDTA</i>
TNE	Tris-NaCL-EDTA
TUNEL	<i>Terminal Transferase dutp Nick End Labeling</i>
UV	Luz ultravioleta
VAP	Velocidade média de percurso
VCL	Velocidade curvo-linear
VSL	Velocidade linear
W	Watt
X	Veze

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
*	interação
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
>	Maior que
+	Mais
±	Mais ou menos
™	Marca Registrada
≤	Menor ou igual
<	Menor que
=	Igual
≥	Maior ou igual
>	Maior que
-	Menos
μ	Micro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	34
3	HIPÓTESE.....	44
4	OBJETIVOS.....	46
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5	MATERIAL E MÉTODO.....	48
5.1	EXPERIMENTO 1.....	48
5.2	EXPERIMENTO 2.....	58
6	RESULTADOS.....	64
6.1	EXPERIMENTO 1.....	64
6.2	EXPERIMENTO 2.....	84
7	DISCUSSÃO.....	96
8	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	104
	ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma ferramenta de grande importância na reprodução, permitindo a utilização mais intensa de animais com alto potencial genético, além de permitir a utilização de animais jovens, gestantes ou lactantes e com infertilidade adquirida (TERVIT, 1996; TANEJA et al., 2000). O uso de animais jovens diminui o intervalo entre as gerações, acelerando com isso o ganho genético (LOHUIS, 1995; TANEJA et al., 2000). No âmbito acadêmico, esta técnica é amplamente utilizada na rotina de laboratórios que pesquisam transgenia, clonagem e outras diferentes áreas da biologia da reprodução (KRISHER; BAVISTER, 1998; KHURANA; NIEMANN, 2000; BARD et al., 2006).

No entanto, apesar da grande aplicabilidade tanto comercial quanto acadêmica, a PIV ainda é considerada uma técnica com eficiência limitada pelo alto custo e pelas condições sub-ótimas de sobrevivência embrionária e fetal (HANSEN et al., 2006). Ao longo dos anos, muitos relatos descrevem que distintos fatores inerentes ao oócito (qualidade), aos diferentes sistemas de cultivo (co-cultura, meios de cultivo, densidade embrionária e diferentes atmosferas gasosas) afetam as taxas de implantação de embriões provenientes da PIV (KHURANA; NIEMANN, 2000). Apesar da importância destes fatores, a influência paterna não pode ser esquecida.

O espermatozóide carrega tanto o material genético haplóide quanto os fatores citoplasmáticos que são necessários para o desenvolvimento embrionário normal, sendo já estabelecido que alterações espermáticas reduzem as taxas de desenvolvimento embrionário (ERENPREISS et al., 2006). A influência paterna atua na fase pré-implantacional, pois apresenta fatores espermáticos importantes para a ativação oocitária (TESARIK, GRECO, MENDONZA, 2002). Em 2005, Tesarik e colaboradores verificaram que a influência paterna possui efeitos negativos no desenvolvimento embrionário mais tardio, quando as células espermáticas apresentam danos no DNA ou apresentam alterações da organização da cromatina espermática. Isso ocorre devido à modificação da expressão de genes paternos.

Apesar da motilidade, do potencial de membrana mitocondrial e da integridade das membranas plasmática e acrossomal estarem diretamente relacionadas à capacidade de fecundação dos espermatozóides, outras características seminais, que podem não prejudicar diretamente a fecundação, tem demonstrado alta relação com problemas de fertilidade

(EVERSON; WIXON, 2006). Assim, a avaliação, tanto da integridade do DNA, quanto da conformação do empacotamento da cromatina são fatores relevantes a serem correlacionados da influência paterna no desenvolvimento embrionário.

Devido à importância que o gameta masculino desempenha no processo da PIV de embriões bovinos, o desenvolvimento de novas técnicas que incrementem a fertilidade de uma amostra de sêmen é de interesse para o setor produtivo. O efeito do laser de baixa potência no sêmen de diferentes espécies animais, demonstrado por diversos autores, sugere a aplicação desta ferramenta como uma possibilidade de aumentar o potencial de fecundação dos espermatozoides, a fim de aumentar os resultados na PIV. Apesar do uso do laser já estar de certo modo bem disseminado, os mecanismos de interação biológica, efeitos da aplicação deste em funções e atributos espermáticos, assim como a influência paterna na PIV, ainda não estão completamente elucidados. No entanto, sabe-se que a interação depende do tipo celular e das características do laser, o que dificulta a extrapolação dos efeitos entre tipos celulares e de laser (CORRAL-BAQUÉS et al., 2005), bem como entre diferentes espécies. O apelo deste trabalho é, portanto, estabelecer a melhor relação potência X duração do tratamento para a irradiação de espermatozoides bovinos com o intuito de aumentar a produção *in vitro* de embriões.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A eficiência reprodutiva dos animais domésticos é uma das maiores preocupações econômicas da pecuária mundial. Segundo Screenan e Diskinn (1983), aproximadamente 90% do sucesso produtivo pode estar relacionado às taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário inicial. A produção *in vitro* (PIV) de embriões (que consiste na maturação, fecundação de oócitos imaturos e cultivo *in vitro* de embriões) é uma poderosa ferramenta no melhoramento animal. No Brasil, esta técnica é amplamente usada na espécie bovina, sendo mais de 255.000 embriões produzidos *in vitro* em 2009, o que representa 85,8% do total de embriões produzidos (VIANA et al., 2010). Porém, o incremento do uso comercial da PIV depende diretamente da melhoria da produção de embriões, com redução do custo.

A PIV é, ainda hoje, considerada uma biotecnologia de baixa eficiência (VIANA et al., 2010), sendo classificada como um sistema de produção subótimo (RIZOS et al., 2002). Isto se deve ao fato desta biotécnica apresentar menor taxa de prenhez (33,52%) quando comparada à produção *in vivo* (41,52%) (PONTES et al., 2009). Contudo, Hansen et al. (2006) consideram que a maioria dos problemas técnicos associados à produção *in vitro* de embriões, pode ser superada por meio de pesquisas inovadoras.

Portanto, técnicas de baixo custo que proporcionem melhorias na qualidade seminal, possibilitando assim, um incremento na produtividade de embriões é de grande interesse para a pecuária nacional.

A influência paterna no desenvolvimento embrionário ocorre já nas primeiras etapas da fecundação (TESARIK; GRECO; MENDONZA, 2004). Defeitos nos espermatozóides podem levar à falha imediata ou em ciclos celulares subsequentes (MÉNÉZO, 2006). Embriões bovinos produzidos por espermatozóides submetidos a danos no DNA, induzido por radiação UV, por exemplo, falham no desenvolvimento a partir de duas células, sugerindo que estes espermatozóides são capazes de ativar o oócito, no entanto podendo haver falha na primeira mitose (BORDIGNON; SMITH, 1999). Fatehi et al. (2006) demonstraram que alguns espermatozóides resistiam à irradiação UV e que atributos como motilidade, atividade mitocondrial, integridade das membranas plasmática e acrossomal desses espermatozóides não diferem quando comparadas aos espermatozóides não irradiados. Porém, uma relação logarítmica altamente significativa entre a dose de irradiação e os danos no DNA espermático foi relatada. Utilizando os espermatozóides irradiados na fecundação *in vitro*, os autores

observaram que não houve redução da capacidade de fecundação dos espermatozóides e nem da taxa de clivagem. Contudo, observaram que quando utilizavam espermatozóides irradiados, ocorria bloqueio do desenvolvimento embrionário após as primeiras clivagens, sinais específicos de apoptose nos embriões e esporádicas formações de blastocistos.

A qualidade seminal é fundamental para a obtenção de altos índices reprodutivos (SAACKE et al., 1994). No entanto, durante a manipulação do sêmen, as células espermáticas são expostas a uma série de fatores deletérios como, diluição, incubação, centrifugação, congelamento e descongelamento que possuem uma reconhecida capacidade de afetar a sobrevivência e o potencial de fecundação (BOE-HANSEN et al., 2005), além de poder causar danos à qualidade genética do sêmen (HAMMADEH et al., 1999; KRZYZOSIAK et al., 2000).

O espermatozóide é responsável por carrear o material genético até o oócito durante a fecundação (KNOBIL; NEILL, 1994), assim a motilidade é muito importante, sendo a movimentação flagelar do espermatozóide sensível às alterações externas ou internas a célula. Para um espermatozóide fecundar um oócito, precisa manter, no mínimo, quatro atributos: a) metabolismo para produção de energia; b) motilidade progressiva; c) enzimas, situadas dentro do acrossoma, essenciais para a aderência e a penetração do espermatozóide no oócito; d) proteínas na membrana plasmática importante para a sobrevivência do espermatozóide dentro do sistema reprodutor feminino (AMANN; PICKETT, 1987).

A análise de sêmen computadorizada (do inglês “Computer-Assisted Sperm Analysis” – CASA) permite uma avaliação objetiva de diferentes características celulares como: movimento, velocidade e morfologia. Dentre as características analisadas estão: velocidade curvo-linear (VCL); amplitude de deslocamento lateral da cabeça em micrometros (ALH), que esta correlacionada com a capacidade do espermatozóide vencer a barreira do muco cervical e penetrar no oócito; frequência de batida cruzada (BCF), que é a frequência na qual a cabeça do espermatozóide cruza o caminho médio do espermatozóide; velocidade média de percurso (VAP), que corresponde à velocidade média do trajeto em $\mu\text{m/s}$; velocidade linear (VSL), que é a velocidade média, em linha reta, do início ao fim do trajeto em $\mu\text{m/s}$; retidão (STR), que é o valor médio da relação percentual entre VSL e VAP (estima quão próximo é o trajeto realizado pela célula a uma reta, sendo 100% o ideal de retidão) e, finalmente, a linearidade (LIN) que é o valor médio da relação percentual entre VSL e VCL (a linearidade é a estimativa da proximidade do percurso da célula com a linha reta) (VERSTEGEN, 2002).

Contudo, maiores evidências que correlacionem os parâmetros analisados pelo CASA com a fertilidade, ainda precisam ser aprofundados.

O espermatozóide é essencial para a fecundação, pois além de carrear o DNA paterno é o responsável em ativar o oócito após a penetração, além de possuir RNAm essenciais para sustentar as primeiras clivagens. Por ser uma célula tão importante, a morfologia, a estrutura, os mecanismos de ação e de sinalização celular são particulares. Por ser uma célula de grande importância na preservação das espécies, possui distintos domínios de membrana, que conferem a cada segmento uma função e uma ação determinadas (KNOBIL; NEILL, 1994). Devido a estas características dos espermatozóides, uma análise detalhada dos diferentes atributos espermáticos é essencial.

A integridade da membrana espermática é fundamental para a sobrevivência do espermatozóide, sendo responsável pelo equilíbrio osmótico celular, funcionando como barreira entre o meio intra e extracelular. Danos na membrana plasmática podem levar à perda da homeostasia e consequente morte celular (AMANN; PICKETT, 1987; AMANN; GRAHAM, 1993). Além disto, a membrana plasmática possui proteínas específicas que facilitam o transporte de glicose e de frutose do ambiente extracelular. Estes substratos são fonte de energia indispensável para a sobrevivência da célula (SILVA; GADELLA, 2006). A integridade da membrana pode ser avaliada com o uso de corantes impermeáveis, assim células que não estiverem coradas indicam que a membrana plasmática está intacta. Sondas fluorescentes impermeáveis à membrana com afinidade pelo DNA também são usadas com este propósito. O iodeto de propídio (IP) é um exemplo destas sondas (SILVA; GADELLA, 2006).

O acrossoma é uma vesícula grande que contém enzimas hidrolíticas, sendo originado pela união de vesículas geradas do complexo de Golgi da espermatíde e transportadas por uma rede de microtúbulos e actina (KIERZENBAUM, A. L., 2008). Durante a reação acrossômica, ocorre a liberação destas enzimas, que são responsáveis pela digestão das células do *cumulus* do oócito, e a exposição de receptores de membrana que são responsáveis pela penetração do espermatozóide na zona pelúcida e consequente fusão com a membrana plasmática (DIAZ-PEREZ, E; THOMAS, P.; MEIZEL, S., 1988).

A integridade do acrossoma pode ser avaliada com o uso de lecitinas conjugadas aos fluoróforos (marcadores de lisossomos) ou de anticorpos anti-proteína intra-acrossomal (anti-CD46). As lecitinas conjugadas se ligam às cadeias de carboidratos glicoprotéicos presentes no acrossoma (SILVA; GADELLA, 2006). A lecitina *Psium sativum* conjugada ao fluoróforo

isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) é uma das mais utilizadas (CELEGHINI et al., 2007)

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de ATP através de respiração aeróbia (TUNER, 2006). Muitos relatos indicam relação direta entre a motilidade e a atividade mitocondrial (TROIANO et al., 1998), porém o mecanismo pelo qual esta relação é estabelecida não está bem compreendido (EDDY; O'BRIEN, 1994). Segundo Ford (2006), a glicólise local pode fornecer energia para o flagelo distal, mas, as evidências de que esta é necessária são fracas, sendo provável que a difusão reforçada pela adenilato quinase e outros transportadores seja suficiente para a troca de ATP, ADP e Pi entre o flagelo e as mitocôndrias presentes na peça intermediária na taxa necessária para sustentar a motilidade espermática.

Há consenso, no entanto, que a integridade da mitocôndria é fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea ou em técnicas de reprodução assistida (SILVA; GADELLA, 2006).

Para a determinação do potencial de membrana das mitocôndrias, dentre as sondas mais utilizadas está 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (SILVA; GADELLA, 2006). O JC-1 é uma carbocianina catiônica lipofílica que é internalizada por todas as mitocôndrias funcionantes fluorecendo em verde. Em mitocôndrias altamente funcionais há um aumento na concentração do JC-1 formando agregados que fluorescem em laranja (GILLAN, EVANS, MAXWELL, 2005).

Apesar da utilização de sondas fluorescentes permitirem uma avaliação rigorosa de muitos atributos seminais, o método de avaliação em microscopia é laborioso limitando o número de células avaliadas. A utilização de sondas fluorescentes, associadas à citometria de fluxo, permite avaliar 200 vezes mais células do que a avaliação por microscopia em menos de 1 minuto, aumentando o tamanho da amostra analisada e diminuindo o tempo requerido (ARRUDA, 2000).

O espermatozóide é uma célula altamente diferenciada, sendo a cromatina organizada de forma única, o que a difere quando comparada a uma célula somática (ROCHA et al., 2002; McLAY; CLARKE, 2003). No final da espermiogênese, as histonas, conjunto de proteínas compactadoras de duplas fitas de DNA, são substituídas por nucleoproteínas específicas chamadas de protaminas (processo denominado de protaminação). Após a ligação com esta proteína, a cromatina se apresenta inerte e altamente condensada pela interação de resíduos amina da protamina com os grupos fosfatos do DNA, neutralizando o esqueleto

fosfodiéster (ROCHA et al., 2002). Aproximadamente 85% do DNA espermático estão associados às protaminas e apenas 15% se mantém associados às histonas (SINGH et al., 2003). Defeitos no DNA, como a quebra da fita que pode afetar uma ou as duas cadeias da molécula de DNA, podem resultar na alteração da sequência original e desencadear efeitos indesejáveis ao embrião (TESARIK et al., 2005).

Uma das técnicas utilizadas para analisar a conformação do material genético espermático é o ensaio de estrutura de cromatina do espermatozóide (do inglês “Sperm Chromatin Structure Assay – SCSA), sendo a correlação deste com a fertilidade de touros a campo, relatada por Saacke et al. (1987). O SCSA baseia-se na marcação do DNA com laranja de acridina, assim tanto a estrutura quanto a estabilidade da cromatina podem ser avaliadas pela técnica da citometria de fluxo.

O SCSA é uma técnica que avalia a susceptibilidade do espermatozóide a sofrer denaturação ácida. Já o ensaio cometa baseia-se na detecção de quebras nas fitas de DNA em célula única, utilizando lâmina de microscopia. A técnica consiste na mistura de sêmen com agarose derretida, sendo esta depositada sobre a lâmina. As células são previamente lisadas, expostas a um pH elevado e as lâminas submetidas à eletroforese horizontal. O alto peso molecular do DNA íntegro é responsável pela manutenção do DNA na cabeça do espermatozóide, enquanto que os pedaços menores do DNA fragmentado migram formando a cauda do cometa, justificando o nome da técnica. Esta técnica já foi utilizada em sêmen de garanhões para detectar danos no DNA em resposta a crio-injúria (LINFOR; MEYERS, 2002); em sêmen suíno foi usada para detectar danos no DNA durante o armazenamento refrigerado (FRASER; STRZEZEK, 2004) e em sêmen bovino usado em estudos com sêmen sexado e após a congelação/descongelação. O ensaio cometa é uma técnica quantitativa, rápida e simples que tem provado ser muito sensível para a detecção de quebras nas fitas de DNA no sêmen humano (HUGHES et al., 1996; IRVINE et al., 2000).

De acordo com Slowinska et al. (2008), ao realizar o ensaio Cometa Alcalino em amostras de sêmen congelados/descongelados, relataram por métodos computadorizados, diminuição de 3,8% de DNA na cabeça do cometa e um aumento de 5,3% no comprimento da cauda. Por serem alterações sutis, os autores recomendam a utilização de métodos computadorizados para esta análise.

Sabendo que um dos principais fatores que pode alterar tanto a fecundação como o desenvolvimento embrionário é a qualidade seminal, o laser de baixa potência tem sido

sugerido como uma possibilidade de aumentar o potencial de fecundação dos espermatozoides, a fim de aumentar os resultados obtidos na PIV.

Light Amplification by Stimulated Emissions of Radiation (LASER) são aparelhos que pela geração de uma descarga elétrica, estimulam elétrons de uma substância radioativa a absorverem energia e a mudarem para uma órbita em um nível mais alto de energia. Porém, por ser instável, este elétron retorna à órbita original, sendo que durante o retorno ocorre um fenômeno denominado emissão espontânea. Este fenômeno compreende a liberação da energia excedente em forma de fóton, uma partícula de transmissão de um tipo de energia eletromagnética (BAXTER, 1994; BAGNATO, 2001).

O fóton oriundo da emissão espontânea vai perturbar outros átomos com elétrons excitados, estimulando o decaimento do elétron excitado e este, ao passar para um estado de mais baixa energia, emite outro fóton que emerge do sistema juntamente com aquele que causou a transição (emissão estimulada). Deste modo, na emissão estimulada, o causador do efeito sai intacto e o fóton gerado, possui a mesma energia e propaga-se na mesma direção. Os dois fótons gerados vão novamente perturbar outros átomos com elétrons excitados, havendo emissão de mais fótons que se juntam aos iniciais. Todos estes fótons, que emergem do sistema são novamente jogados sobre ele por meio de espelhos, fazendo com que os fótons emitidos interajam mais com os átomos. Desta forma, há multiplicação do número de fótons emitidos pelo processo de emissão estimulada, amplificando a quantidade de luz que sairá do sistema. Após vários passos, os fótons que se movimentam através do meio que forma o laser, constituirão um feixe que apresenta alta intensidade. Uma abertura no sistema em uma das extremidades do espelho permite que uma fração desta luz deixe o sistema continuamente. A luz laser tem como propriedades serem monocromáticas, atingirem altas intensidades, ter feixe unidirecional e possuir coerência, esta última propriedade significa que as ondas eletromagnéticas possuem mesma direção e comprimento de onda (BAGNATO, 2001).

Características do laser, como potência e propriedades terapêuticas são definidas pelo comprimento de onda que por sua vez depende da substância radioativa que o compõe. Quanto menor o comprimento de onda, maior a ação e o poder de penetração (ROCHA JÚNIOR et al., 2007). A substância radioativa ou meio ativo, pode estar na forma de cristais sólidos, como o ruby sintético (*neodymium: yttrium aluminium garnet* – **Nd:YAG**), de gases, como o *helium néon* (He-Ne) e o dióxido de carbono (CO₂) ou de semicondutores diodos, como o *gallium arsenide* (GaAs) e o *gallium aluminium arsenide* (GaAIAs) (ENWEMEKA, 1988).

O laser de baixa potência emite uma energia com efeitos fotobiológicos, fotofísicos, fotoquímicos e não-térmicos (ROCHA JÚNIOR et al., 2007). A utilização terapêutica depende se o efeito biológico, o qual o laser pode apresentar, é estimulador ou inibidor (KANEPS et al., 1983).

A reatividade de átomos e moléculas depende da estrutura eletrônica, dos níveis de energia e das possíveis transições, fundamentais para as interações intra-átomos ou intramolecular (PASSARELA; DECHECCHI; QUAGLIARIELLO, 1981). Estes autores demonstraram que a irradiação com potência de 13 mW, de laser He-Ne, em soluções de NADH induz alterações no comportamento bioquímico desta coenzima. Experimentos alterando co-fatores e enzimas demonstraram que o NADH é sensível a irradiação laser e pode estar envolvido no mecanismo de alteração da atividade intracelular, causada por este.

Assim como o NADH, acredita-se que existam outros fotoceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que absorvem os fótons desencadeando reações químicas, como por exemplo, a glicólise e a oxidação fosforilativa, resultando na aceleração da síntese, da transcrição e da replicação de DNA, em longo prazo (KARU, 1987).

A utilização do laser como terapia analgésica e antiinflamatória foi eficazmente demonstrada por Ozdemir et al. (2001) e Porter et al. (2005), respectivamente, sendo utilizada efetivamente em áreas como a fisioterapia, a dermatologia e a odontologia.

Peplow et al. (2010) realizaram uma extensa revisão avaliando o efeito do laser de baixa potência na proliferação e na viabilidade celular *in vitro* de diversos tipos celulares de humanos e de animais. Dentre eles células-tronco, células endoteliais, células da musculatura lisa, queratinócitos, monócitos, fibroblastos e linhagens celulares foram estudados. Os parâmetros avaliados incluíam número de células, viabilidade celular, dano de DNA, integridade de membrana, síntese e liberação de proteínas, morfologia celular, organelas celulares e características ultraestruturais. Em decorrência da aplicação de laser foi demonstrada proliferação celular incluindo medidas como número de célula, viabilidade celular, integridade de membrana e dano de DNA e diferenciação de células-tronco em tipos celulares específicos. Os achados demonstram a habilidade do laser em modular a proliferação celular (geralmente estimulação). Entre os mecanismos moleculares relacionados observou-se ativação da cadeia respiratória mitocondrial e início da sinalização celular como a indução da fosforilação do receptor da proteína tirosina quinase. Os efeitos diretos do laser puderam ser detectados 1 a 3 horas após a irradiação, enquanto que os efeitos indiretos (proliferação e expressão de proteínas) necessitam de um período superior à 24h. Deste modo,

a efetividade do laser em aumentar ou diminuir a proliferação celular em diversos tipos celulares e a dependência dos parâmetros de irradiação como comprimento de onda, potência, fluência, número de exposições e intervalo entre exposições estão bem consolidadas.

Na área de reprodução, utilizando-se um comprimento de onda de 780 nm (13 mW e 40 mW) do laser diodo e laser de gás He-Ne (10 mW e 35 mW), com um comprimento de 633nm em baixa potência foi verificado aceleração do transporte de cálcio em espermatozóides irradiados. Tal resultado indica que o laser pode causar alterações na concentração de cálcio intracelular, o que em se tratando de espermatozóide, tem papel regulatório no controle da motilidade e na reação acrossomal (LUBART et al., 1992).

O laser He-Ne (10mW) foi utilizado como alternativa para a indução da capacitação espermática, sendo também eficiente em induzir a reação acrossomal, o que resultou numa diminuição da mortalidade espermática quando comparado com outros agentes capacitantes, como o cálcio ionóforo e a heparina (OCAÑA-QUERO, 1997).

Lubart et al. (2000) observaram que ao irradiar amostras de sêmen bovino com laser com comprimentos de onda de 360, 630, 660 e 830nm, a produção de radicais hidroxilas foi estimulada. Tal produção é baseada na hipótese de que os fotoceptores (porfirinas endógenas, os citocromos de membrana e as mitocôndrias) responsáveis pela fotobioestimulação são foto-sensibilizadores, e, portanto geram EROs (espécies reativas de oxigênio) após a irradiação. Lavi et al. (2011) demonstraram a indução da produção de EROs em membrana espermática isolada quando irradiada com comprimentos de onda de 400 a 800nm e potências de 40 ou 130mW/cm².

O laser diodo com comprimento de 1,48µm induziu imobilização e permeabilização da membrana plasmática em espermatozóides humanos (MONTAG et al., 2000). Quando utilizado para a imobilização de espermatozóide para a injeção intra-citoplasmática de espermatozóides (ICSI) na reprodução humana, apresentou bons resultados de fecundação, de desenvolvimento embrionário e de formação de blastocisto *in vitro* (EBNER et al., 2002). Em reprodução humana também foi demonstrado aumento significativo na motilidade de espermatozóides humanos, após 30 minutos de tratamento laser de 905nm (50mW/cm²), sem haver aumento significativo do dano ao DNA (FIRESTONE et al., 2011).

Corral-Baqués et al. (2005) relataram aumento significativo na motilidade espermática de cães, 15 a 45 minutos após a irradiação, com comprimento de onda de 655nm de laser diodo (21,7 mW) e queda na produção de L-lactato. Esta relação inversa entre a motilidade e a produção de lactato, indica uma alteração no metabolismo aeróbico, para a produção de

energia e um provável aumento na eficiência energética. Em sêmen canino também foi avaliado o efeito da aplicação laser (655nm) em diferentes potências (6.8mW, 14.5 mW, 33.1 mW e 49.7mW) na motilidade de espermatozóides. Este estudo relatou efeitos mais intensos, proporcionais ao aumento da potência (CORRAL- BAQUÉS et al., 2009).

Em outros animais, como o peru, com a utilização de laser de gás He-Ne (6 mW) também foi demonstrado aumento de motilidade e de qualidade seminal após armazenamento de até 60 horas, após irradiação (IAFFALDANO et al., 2005). Na espécie eqüina, Brandão (2008) obteve aumento da frequência de batimento flagelar em sêmen fresco e observou melhor proteção às membranas plasmática e acrossomal após 2h de incubação, utilizando laser diodo (50 mW) com 650 nm de comprimento de onda. Já em sêmen de coelhos, a aplicação de laser He-Ne (6 mW) proporcionou efeito de proteção na motilidade, viabilidade e integridade de acrossomo durante o armazenamento do sêmen (IAFFALDANO, 2010).

Apesar do uso do laser estar de certo modo disseminado, os mecanismos de interação biológica, ainda não estão completamente elucidados. O efeito do laser depende dos parâmetros de irradiação e do tipo celular. A falta de informação sobre a irradiação utilizada, assim como uma minuciosa avaliação da potência, do tempo, da área a ser irradiada e da fluência do estímulo utilizados nos trabalhos disponíveis sobre o assunto, dificultam a repetibilidade e a reprodução dos resultados. Na área da reprodução animal existem relatos da utilização do laser em diversas espécies, com resultados positivos sobre as características seminais. Porém, há escassez de trabalhos que testem o potencial de fecundação destas amostras, corroborando para a hipótese de que a utilização do laser é uma ferramenta de incremento da fertilidade e permite a avaliação deste efeito melhorando o desenvolvimento embrionário subsequente.

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

A onda eletromagnética (LASER) tem efeito sobre a viabilidade espermática, sendo esse efeito dependente da duração do tratamento e da potência aplicada. As ondas eletromagnéticas apresentam efeito positivo sobre a viabilidade espermática resultando numa melhora na produtividade *in vitro* de embriões bovinos

.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Os objetivos desta dissertação foram divididos em geral e específicos.

4.1 GERAL

Verificar o efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a produção *in vitro* de embriões

4.2 ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito da duração do tratamento, da potência e da interação Duração do tratamento*Potência das ondas eletromagnéticas sobre a viabilidade espermática, imediato e 30 minutos após a aplicação.
- 2) Determinar a melhor combinação duração do tratamento X potência das ondas eletromagnéticas sobre a viabilidade espermática.
- 3) Avaliar o efeito da combinação duração do tratamento X potência das ondas eletromagnéticas sobre a produção *in vitro* de embriões

MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal e no Laboratório de Andrologia, ambos nas dependências do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus São Paulo – Cidade Universitária.

5.1 EXPERIMENTO 1

O experimento 1 teve como objetivo avaliar o efeito da duração do tratamento, da potência e da interação Duração do tratamento*Potência de ondas eletromagnéticas sobre a viabilidade espermática. Para tanto, palhetas de sêmen congelado de touros (n=9), doados de Centrais de Processamento e Colheita de Sêmen (CPCs) foram utilizadas. As potências das ondas eletromagnéticas utilizadas foram de 0,5, 7,5 ou 10mW e a duração do tratamento de 5 ou 10 minutos. As combinação das potências e a duração dos tratamentos resultaram na formação de 6 grupos tratados e respectivos controles (Quadro 1).

Grupo	Potência (mW)	Duração (min)	Fluência (J/cm ²)	Grupo	Potência (mW)	Duração (min)	Fluência (J/cm ²)
1	5	5	0.156	1C	0	5	0
2	5	10	0.312	2C	0	10	0
3	7,5	5	0.234	3C	0	5	0
4	7,5	10	0.468	4C	0	10	0
5	10	5	0.312	5C	0	5	0
6	10	10	0.624	6C	0	10	0

Quadro 1- Potência, duração do tratamento e fluência dos grupos tratamento e controle - São Paulo - 2011

Amostras e irradiação:

Três palhetas do mesmo touro foram descongeladas em água a 37°C, durante 30 segundos. O conteúdo foi centrifugado em 6mL de meio TALP sem Phenol Red (ANEXO A), em tubo cônico de 15mL a 200 x g por 6 minutos, para a retirada do diluidor e do plasma seminal. O sobrenadante foi descartado e 600µl do sedimento contendo os espermatozóides foram re-suspendidos em meio TALP sem Phenol Red, para a concentração final de 7×10^6 espermatozóides/mL. A concentração espermática foi calculada utilizando-se câmara de Neubauer, em diluições de 10 a 20X, em água. Após a preparação dos espermatozóides, uma alíquota foi retirada para a realização das análises imediatamente anterior à exposição dos espermatozóides às ondas eletromagnéticas (tempo pré). Posteriormente, a amostra foi dividida em grupo controle (não submetida às ondas eletromagnéticas - incubadas) e grupo tratado (submetida às ondas eletromagnéticas - irradiadas).

O procedimento foi repetido para cada tratamento e o respectivo controle. Foram utilizadas palhetas de mesma partida ou da mesma combinação de partidas, para todos os grupos, tratado e controle.

O equipamento utilizado para a produção destas ondas eletromagnéticas (LASER) foi o sistema da Unilaser projetado e desenvolvido na UNICAMP, o qual possui fonte de luz de 633nm de comprimento de onda de laser He-Ne, com potência máxima de 24,5mW. Para garantir a repetibilidade do experimento e a precisão dos dados fornecidos, utilizou-se um sistema óptico com lentes e filtro espacial. O aparelho foi calibrado para que o feixe de ondas eletromagnéticas fosse amplo o suficiente para abranger toda a amostra, para que as características das ondas eletromagnéticas (coerência) fossem mantidas e que a frente de onda fosse uniforme. O tratamento foi realizado em local escuro e o sistema óptico montado dentro de um aparato constituído por duas caixas de isopor, para impedir entrada de luz externa (Figura 1).

Figura 1 – **A**: Fotografia do sistema óptico em ambiente iluminado; **B**: Fotografia do sistema óptico em ambiente escuro – São Paulo – 2011

O campo de irradiação foi fotografado, a imagem digitalizada (Figura 2 - **A** e **B**) e analisada em software de análise de imagens IMAGE JTM, disponível gratuitamente na internet. Analisou-se a homogeneidade das ondas eletromagnéticas no campo de irradiação pela distribuição de pixels da imagem transformada em um gráfico em três dimensões (Figura 2 - **C**, **D**, **E** e **F**). A potência das ondas do campo de irradiação foi verificada utilizando-se um medidor de potência óptica (U.S. Laser Corp. N.1034-2).

O sistema óptico foi emprestado do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC. A montagem e a calibração foram realizadas pela física Taciana Deprá Magrini, mestre em Nanociências e Materiais Avançados da área de Biosistemas e Biofotônica e pelo físico em medicina Thiago Dreyer, aluno de mestrado em Nanociências e Materiais Avançados na área de Biosistemas e Biofotônica, sob orientação dos professores doutores Herculano Martinho da Silva e Marcella Pecora Milazzotto, respectivamente.

O sistema foi desenvolvido com a utilização de duas lentes, fenda circular, filtro óptico e espelho defletor. As diferentes potências foram obtidas pela utilização de filtros ópticos distintos e a potência desejada foi confirmada utilizando-se um medidor de potência óptica. Uma variação de até 30% para mais ou para menos foi adotada na potência média, pois flutuações na corrente elétrica influenciam a potência de saída gerada pelo equipamento. Há ainda diferença da intensidade de ondas entre o centro e a borda da placa e o próprio erro intrínseco da técnica de medição de potência foram considerados para estabelecer a potência empregada.

Figura 2 - Análise da homogeneidade da distribuição das ondas eletromagnéticas no campo de irradiação. **A e B** fotografia do campo de irradiação. **C, D, E e F** gráfico 3D da distribuição de pixels – São Paulo – 2011

A amostra (3mL do grupo tratado) foi distribuída por toda a superfície da placa de Petri pequena (diâmetro = 35mm), sendo posicionada sob o campo de incidência de ondas eletromagnéticas sobre placa aquecida, de modo que o campo abrangesse toda a amostra. A placa contendo os 3 ml da amostra do grupo controle correspondente foi posicionada sob a mesma placa aquecida, porém coberta por um aparato para bloquear completamente a incidência das ondas eletromagnéticas.

Metade do volume das amostras (1,5mL), de cada grupo foi retirada para análise, imediatamente após a duração do tratamento (irradiação ou incubação) de cada grupo (tempo pós) e a metade restante (1,5mL), mantida em incubação a 37°C. Após trinta minutos do início do tratamento, o restante da amostra foi submetido às análises finais (tempo final).

Análises Espermáticas

Motilidade Espermática Visual:

A porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo em escala de 0 a 100% e vigor, o qual representa a força de propulsão do espermatozoide classificado de 0 a 5, sendo 0 - sem movimento e 5 - movimento vigoroso. Estas análises foram realizadas em microscópio óptico de luz, em aumento de 200X, entre lâmina e lamínula a 37°C, utilizando-se gotas de 10µL da amostra.

Durante a avaliação da motilidade foi também avaliada a presença ou a ausência e a intensidade de aglutinação das células espermáticas, comumente encontrada após o processo de centrifugação. Esta foi caracterizada pela aderência das células na lâmina ou lamínula, no qual se observam células sem movimento de progressão, apesar de intenso batimento flagelar. Padrão de aglutinação cabeça-cabeça, as quais cabeças de duas ou mais células espermáticas se apresentam unidas, também podem ser observadas e avaliadas. Em todas as avaliações de motilidade este padrão de movimento foi classificado utilizando-se escala de cruzes (no qual nenhuma cruz indicou ausência de aglutinação e +++ alto grau de aglutinação). A aderência das células à lâmina ou lamínula pode causar uma subestimativa da motilidade, devendo ser avaliada conjuntamente.

Análise de Motilidade Espermática Computadorizada:

A análise computadorizada foi realizada utilizando-se o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) da Hamilton Thorne IVOS, do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Valquiria Hypollito Barnabe.

As câmaras aquecidas à 37°C foram preenchidas com 5µL de amostra e 10 campos foram selecionados para análise, os parâmetros utilizados para a seleção dos campos foram ausência de grumos e ausência de aglutinações.

Citometria de Fluxo:

A integridade da membrana acrossomal, a integridade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial, dos grupos tratado e controle foi analisado em citômetro de fluxo. O preparo das amostras para a leitura no citômetro de Fluxo está sumarizado no Quadro 2. O preparo das soluções de PI, FITC-PSA e JC-1 estão descritas no ANEXO B.

Sonda	Quantidade espermática (cels)	Volume da Sonda (µL)	Tempo de Incubação (min)	Temperatura de Incubação (°C)
PI (6µM)	750.000	3	5	37
FITC-PSA (100µg/mL)	750.000	50	5	37
JC-1 (50µg/mL)	750.000	2	5	37

Quadro 2 - Concentração espermática, concentração e volume das sondas fluorescentes, tempo e b temperatura de incubação no preparo das amostras para a leitura no citômetro de fluxo - São Paulo - 2011

As sondas PI e FITC-PSA foram adicionadas na mesma amostra seminal, obtendo-se assim o resultado combinado entre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, da mesma população de células.

Os gráficos destes ensaios foram analisados utilizando-se o software FlowJo v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star INC., Ashland, Oregon, USA). Para a análise dos gráficos, a população de interesse foi identificada e selecionada segundo o tamanho e a fluorescência das mesmas. Esta etapa foi necessária, pois partículas muito grandes e com alta fluorescência costumam representar células aglutinadas e partículas muito pequenas com

fluorescência média a baixa, costumam ser sujidades ou partículas de sonda livres. Após a determinação e a seleção da população de interesse, as análises foram realizadas.

FITC-PSA/PI: observou-se a distribuição da população de interesse em duas subpopulações de acordo com a intensidade de fluorescência verde. O gráfico foi transformado em histograma (Figura 3 – **A**) e o ponto de encontro da queda da população de baixa fluorescência e do aumento da população de alta fluorescência foi utilizado como ponto de corte. Células que apresentaram fluorescência superior a este ponto foram consideradas verdes positivas (acrossomo íntegro - AI) e as que apresentaram fluorescência inferior a este ponto foram consideradas verdes negativas (acrossomo lesado - AL). A mesma metodologia foi adotada para a fluorescência vermelha (Figura 3 - **B**), fluorescência superior ao corte, vermelha positiva (membrana plasmática lesada - PL) e fluorescência inferior ao corte, células vermelhas negativas (membrana plasmática íntegra - PI). Os cortes para as duas fluorescências, quando simultâneos e aplicados à mesma população (Figura 3 - **C**) originaram quatro populações (APII, AIPL, ALPI E ALPL).

Figura 3 - Gráficos da análise pelo software FlowJo v8.7 para a análise da associação de sondas FITC- PSA/PI. **A:** histograma da fluorescência verde; **B:** histograma da fluorescência vermelha; **C:** gráfico das fluorescências verde/vermelha, no qual estão representadas as quatro populações e respectivas porcentagens - São Paulo – 2011

JC1: a sonda JC-1 determina o potencial de membrana mitocondrial. Fluoresce em verde quando a membrana mitocondrial apresenta alto potencial e em vermelho quando apresenta baixo potencial. Como as células espermáticas podem apresentar graduações do potencial de membrana mitocondrial, é comum detectar fluorescências que vão desde o verde, passando pelo alaranjado até o vermelho. Portanto, para captar todos os possíveis espectros de fluorescência, a análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada empregando a fluorescência amarela (figura 4). A população que fluoresce intensamente em amarelo, representa células com alto potencial de membrana mitocondrial, pois a excitação e a emissão desta fluorescência são cruzadas com as da fluorescência verde. Já a população que apresenta baixo potencial de membrana mitocondrial será representada na baixa intensidade de fluorescência amarela. Isso porque, no comprimento de onda da fluorescência amarela, células que emitiriam fluorescência vermelha serão pouco excitadas por este comprimento de onda. Em algumas amostras analisadas, as células foram divididas em subpopulações, delimitadas pelas diferentes intensidades de fluorescência, variando entre duas a três subpopulações (Figura 4 - **A** e **B**). Já em outras, as células estavam distribuídas gradualmente de acordo com a intensidade de fluorescência, sem a divisão em subpopulações definidas (Figura 4 - **C**). Por este motivo foi estabelecido dois pontos de corte ao longo da intensidade de fluorescência com base na distribuição das células. A população que apresentava fluorescência superior a nota de corte mais alta foi definida como população de alto potencial de membrana mitocondrial, a população que se localizava entre os dois pontos de corte foi definida com potencial de membrana mitocondrial intermediário e a população com fluorescência inferior ao ponto de corte mais baixo, definida como população com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Os dois pontos de corte estabelecidos foram mantidos para todas as amostras analisadas.

Figura 4 - Gráficos das amostras coradas com JC-1 analisados no citômetro de fluxo. **A:** populações de alto e baixo potencial bem definidas; **B:** populações de potencial intermediário e baixo bem definidas; **C:** população de baixo potencial bem definida e populações de potencial intermediário e alto distribuídas gradualmente

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): este ensaio foi adaptado (Anexo C) do protocolo descrito por BoeHansen et al. (2005). O procedimento foi realizado em sala escura, sendo adicionadas 200.000 células em 50µL de tampão TNE, acrescido de 100µL de detergente ácido. Após 30 segundos foram acrescentados 300 µL de solução de Laranja de Acridina, sendo as amostras então avaliadas após 3-5 minutos. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava[®] Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para a validação do SCSA e a caracterização das populações a serem analisadas, o controle da população de células negativas (não suscetíveis à ação do detergente ácido –

fluorescência verde) e o de células positivas (suscetíveis à ação do detergente ácido – fluorescência vermelha) foram determinados. Para isto, uma amostra de sêmen de um animal aleatório foi submetida à incubação por duas horas com peróxido de hidrogênio 30% na proporção 1:2 de volume de amostra e de peróxido de hidrogênio, respectivamente, sendo este considerado o controle positivo (Figura 5–B). Uma amostra de mesma partida, do mesmo animal foi apenas descongelada e lavada para o controle negativo (Figura 5–A). Realizou-se o SCSA no controle negativo obtendo-se um histograma com pico único, analisou-se a amostra positiva, obtendo-se também um pico único, porém deslocado á direita no histograma de AlfaTYlog. A amostra formada foi analisada com a mistura em mesma proporção (50%) dos dois controles, obtendo-se dois picos (Figura 5-C). O ponto médio entre os dois picos foi estabelecido como ponto de corte para a consideração das células positivas ou negativas para o SCSA.

O AlfaTYlog é o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelho + verde) e serve para quantificar a extensão da denaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozóide.

Figura 5 - Gráficos do ensaio SCSA. **A:** controle negativo; **B:** controle positivo; **C** mistura 1:1 controle positivo/controlado negativo

Análise Estatística:

As amostras foram analisadas em um arranjo fatorial 4 x 2 (4 potências 0, 5, 7,5 ou 10 mW x 2 períodos duração do tratamento 5 ou 10 minutos). Em cada combinação foram avaliadas as variáveis motilidade visual; vigor; aglutinação; motilidade computadorizada; motilidade progressiva; STR; linearidade; BCF; VCL; VSL; ALH; VAP; elongação; lesão/integridade de membranas plasmática, acrossomal e respectivas associações; potencial de membrana mitocondrial alta, intermediária e baixa e positividade/negatividade ao SCSA. Os efeitos de potência, duração do tratamento, tempo e todas as interações duplas e triplas sobre cada variável dependente foram analisados por análise de variância com medidas repetidas no tempo (split-plot ANOVA). O momento PÓS foi o tempo imediatamente pós-irradiação e o FINAL, trinta minutos após o início da irradiação. Utilizou-se PROC MIXED do software SAS, versão 9.2. Considerou-se o efeito de touro como um efeito aleatório. Para cada variável, as médias e erros padrão da média, referentes a cada efeito testado foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos (LSmeans). Os efeitos foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

5.2 EXPERIMENTO 2

Produção *in vitro* de Embriões:

Ovários de vacas destinadas ao abatedouro comercial foram colhidos no matadouro e transportados em recipiente térmico, contendo solução salina estéril, aquecida a 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados 2X em solução salina aquecida a 30°C, e os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm cortados com auxílio de bisturi em Becker, contendo 50mL de meio de fatiamento (Anexo D). Após todos os folículos terem sido cortados, o ovário foi mergulhado e agitado com movimentos circulares, auxiliando na recuperação dos complexos *cumulus oophorus* (CCO). Posteriormente, a solução contendo o meio de fatiamento, o líquido folicular e os CCOs foi depositada em tubo cônico de 50mL, permanecendo em repouso por 10 minutos em água à 37°C. Após este período, o sedimento de cada tubo foi removido com auxílio de pipeta pasteur e depositado sobre um filtro de células de 100µm (Cell strainer, BD Falcon TM). O conteúdo retido no filtro foi recuperado e colocado em tubo cônico de 50mL e o filtro lavado com meio de fatiamento, sendo aplicado um suave jato de meio, com auxílio de seringa de 20ml e agulha 21G. A solução recuperada foi depositada em

placa de Petri (90mm) para rastreamento dos complexos *cumulus oophorus* e posterior seleção, em estereomicroscópio. Apenas oócitos apresentando camada de células do *cumulus oophorus* íntegra, espessa e compacta, assim como citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV). Após o rastreamento, os CCOs foram depositados em placa de Petri pequena (35mm) contendo meio de lavagem MIV (Anexo D) e após a seleção foram lavados em meio de maturação (Anexo D). A lavagem foi realizada, colocando-se os CCOs em gotas de 100µl de meio e fazendo 3 passagens sequências para outras gotas de 100µl de meio. Em seguida, os oócitos foram colocados para a MIV, sendo colocados 20 a 30 oócitos em gotas de 90µl do meio de maturação, sob óleo mineral. A maturação foi realizada em incubadora a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 22 a 24 horas.

Após o período de maturação, os oócitos foram avaliados quanto à expansão das células do *cumulus*, indicação da maturação oocitária. Os oócitos maturados foram lavados em meio de lavagem FIV (Anexo E) e em seguida em meio FIV Gota (PARRISH et al., 1988 - Anexo E). Para a fecundação *in vitro*, o mesmo procedimento de descongelação, lavagem, análise e diluição final, descrito para os espermatozóides no experimento 1 foram utilizados. A potência de 5 mW e o período de 10 minutos de incidência das ondas eletromagnéticas foram escolhidos, pois no experimento 1 foi a relação Duração do tratamento*Potência que apresentou melhor efeito sobre a viabilidade espermática.

Os espermatozóides (7×10^6 /mL) foram submetidos às ondas eletromagnéticas na potência de 5 mW por 10 minutos de exposição (grupo tratado) ou apenas incubados durante 10 minutos (grupo controle). Imediatamente após o término do tratamento (tempo pós), gotas de 150µL do meio FIV-gota, contendo 20-30, sob óleo mineral foram inseminadas com um total de $10,5 \times 10^4$ espermatozóides (15µl). A FIV foi realizada em atmosfera controlada, com 5% de CO₂ em ar, 38,5°C e alta umidade por 18 horas.

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram lavados, sendo o excesso de células do *cumulus* removido mecanicamente em meio de lavagem FIV (Anexo E). Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados em meio SOF (Anexo F) e cultivados por 12 dias neste meio, com co-cultivo de células do *cumulus* em estufa a 38,5° C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

O índice de clivagem foi determinado no terceiro dia de cultivo, e o de blastocisto no sexto, nono e décimo segundo dia de cultivo. Estes índices foram calculados com base no número total de estruturas colocadas para a MIV. No terceiro dia de cultivo, juntamente com

avaliação do índice de clivagem, 45µl de meio SOF foram acrescentados às gotas de cultivo. No quinto dia, 90µl de meio foram retirados das gotas de cultivo, sendo repostos por meio novo.

No nono dia de cultivo, todos os embriões que atingiram o estágio de blastocisto com morfologia compatível a estruturas viáveis foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora em temperatura ambiente e armazenados em PBS-PVP (Anexo G) à 4°C até o dia da realização do ensaio TUNEL.

TUNEL: no dia do ensaio, os embriões foram colocados em solução de permeabilização (Anexo G) à temperatura ambiente, por duas horas e em seguida, lavados em PBS-PVP. Os embriões foram então incubados com 25µL de mistura de reação de TUNEL (contendo dUTP conjugado com isothiocyanate de fluoresceína e a enzima desoxinucleotidil transferase terminal preparados segundo instruções do fabricante (In situ cell death detection kit fluorescence, ROCHE) por uma hora à 37°C, em câmara úmida e escura.

Posteriormente à incubação, os embriões foram lavados em PBS-PVP e corados com Hoechst 33342 (5µg/mL) por 15 minutos, em temperatura ambiente. Os embriões foram novamente lavados e colocados entre lâmina e lamínula com 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO – Sigma ST.Lous, MO, USA) para avaliação em microscópio de epifluorescência IX80 (Tóquio, Japão). Cada embrião foi analisado individualmente, sendo o número total de células (núcleo azuis coradas pelo Hoechst) e o número de células embrionárias com fragmentação de DNA (núcleos verdes) visualizados pelos filtros DAPI e FITC, respectivamente.

Para os grupos controle positivo e negativo do ensaio TUNEL, embriões produzidos pela mesma técnica foram incubados durante 1 hora em câmara úmida e escura à 37°C, com DNase I (ANEXO G). Após a permeabilização e a incubação com DNase I, metade destes embriões foram incubados com a mistura de reação TUNEL formando o controle positivo e a outra metade incubada apenas com os dUTPs conjugados formando o controle negativo. Os embriões foram corados com Hoechst, colocados entre lâmina e lamínula com 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO – Sigma ST. Lous, MO, USA) e avaliados para verificar a eficiência do ensaio de TUNEL.

Alíquotas do sêmen irradiado (grupo tratado) e do grupo controle de cada manipulação foram congeladas a -20°C, para realizar o ensaio do cometa alcalino, objetivando avaliar a fragmentação do DNA espermático.

Ensaio Cometa Alcalino:

O protocolo utilizado foi adaptado de Donnelly et al (2000) e as soluções utilizadas encontram-se descritas no Anexo H. Lâminas de microscopia foram previamente preparadas com uma fina camada (1mL) de agarose normal melting (NM) 1% em TBE, e deixadas secar em temperatura ambiente. Sobre a camada de agarose NM seca foi adicionado 100 µl da amostra de sêmen diluído (5×10^5 espermatozóides/mL) em agarose low melting (LM) 0,75% em TBE e coberto por lamínula. As lâminas foram acondicionadas à 4°C para solidificação do gel. Após a solidificação do gel de agarose LM, a lamínula foi cuidadosamente removida, sendo acrescidos mais 300 µL de agarose LM, e esta novamente coberta com lamínula e acondicionada à 4°C, para solidificação do gel. Posteriormente à solidificação, a lamínula foi novamente retirada, sendo adicionado 1 ml da solução de lise I. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 55°C, por uma hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem, utilizando-se uma piceta com água ultrapura (H₂O MilliQ™) para a remoção da solução de lise I, procedido pelo acréscimo de 1mL da solução de lise II. Após a adição da solução de lise II, as lâminas foram acondicionadas à 4°C, por duas horas. Após as etapas de lise, as lâminas foram lavadas, posicionadas na cuba de eletroforese e imersas na solução de corrida (Anexo H), gelada por 20 minutos. A eletroforese foi realizada a 3V/cm e 270 mA, por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com TBE, desidratadas e secas a temperatura ambiente.

No dia da leitura, as lâminas foram reidratadas com água ultrapura por uma hora e coradas com 1 mL de Syber Green (Anexo H) diluído 5.000X, também por uma hora em câmara escura. Ao término deste período, as lâminas foram lavadas com água ultrapura, secas e cobertas por lamínulas.

As imagens foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus IX80 (Tóquio, Japão) com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 600nm, equipado com câmera OLYMPUS Q-Color™ de 5 megapixels, em aumento de 200X. As imagens de 50 a 70 células foram selecionadas aleatoriamente e analisadas com o software de imagens Comet Score™, disponibilizado gratuitamente na internet pela empresa Tritex-Corp (http://autocomet.com/products_cometscore.php).

O programa fornece um quadro de mensuração retangular para a avaliação dos cometas. As células foram avaliadas quanto às variáveis: comprimento do cometa, altura do cometa, área do cometa, intensidade do cometa, intensidade média do cometa, diâmetro da cabeça, área da cabeça, intensidade da cabeça, intensidade média da cabeça, porcentagem de

DNA na cabeça, comprimento da cauda, área da cauda, intensidade da cauda, intensidade média da cauda e porcentagem de DNA na cauda.

Análise Estatística:

As amostras seminais foram analisadas em um arranjo fatorial 2 x 3 (2 tratamentos: irradiado e controle em três momentos de análise T0, T10 e T30). Em cada combinação foram avaliadas as variáveis motilidade visual; vigor; aglutinação; lesão/integridade de membranas plasmática, acrossômica e associação; potencial de membrana mitocondrial alta, intermediária e baixa; positividade/negatividade ao SCSA; comprimento do cometa; altura do cometa; área do cometa; intensidade do cometa; intensidade média do cometa; diâmetro da cabeça; área da cabeça; intensidade da cabeça; intensidade média da cabeça; DNA na cabeça; comprimento cauda; área da cauda, intensidade da cauda, intensidade média da cauda e DNA na cauda.

Os efeitos de tratamento, tempo e interação Tratamento*Tempo de cada variável dependente foram avaliados por análise de variância com medidas repetidas no tempo (split-plot ANOVA), O tempo T0 foi considerado a análise antes do tratamento, T10 imediatamente após o tratamento e o T30, trinta minutos após o início do tratamento. Utilizou-se PROC MIXED do software SAS, versão 9.2. Considerou-se o efeito de touro como um efeito aleatório. Para cada variável, as médias e erros padrão da média, referentes a cada efeito testado foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos (LSmeans).

Os resultados foram analisados pelo programa SAS System for Windows (versão 9.2) e testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo obedecidas as premissas estatísticas utilizou-se o teste *t de Student* para comparação de média de dois tratamentos (PROC TTEST) para as variáveis dependentes relacionadas à características embrionária e taxas da produção de embriões *in vitro*. O nível de significância considerado foi de 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

Os resultados da análise de variância encontrados no experimento 1 estão apresentados sumarizados na tabela 1, contendo o valor de p do efeito da potência, da duração do tratamento e do momento de análise, assim como as interações dos efeitos para cada parâmetro analisado.

Para os efeitos ou interações que apresentaram significância, com $p < 0,05$ ou tendência $0,05 \leq P < 0,10$, os valores da média e o respectivo erro padrão da média, para cada grupo estão apresentados em forma de gráfico de colunas.

Tabela 1 - Valor de p do efeito, da potência, da duração do tratamento e do momento de análise, assim como as interações dos efeitos para cada parâmetro estudado. São Paulo, 2011

Parâmetro\Efeito	Potência	Duração	Tempo	Pot*Dur	Pot*Tem	Dur*Tem	Pot*Dur*Tem
Motilidade	0,0533	0,1965	0,5587	0,7785	0,0164	0,1526	0,6124
Motilidade Casa	0,2782	0,6586	0,4792	0,1985	0,2620	0,3111	0,5629
Vigor	0,9967	0,7281	0,1427	0,8178	0,0620	0,1094	0,8483
Aglutinação	0,7877	0,0061	0,1056	0,4753	0,6477	0,9767	0,5291
Progressiva	0,2452	0,9517	0,2812	0,0780	0,3065	0,1796	0,4215
STR	0,6590	0,4931	0,6902	0,5858	0,1312	0,7490	0,6862
Linea	0,2254	0,3818	0,1926	0,9666	0,2188	0,8369	0,9311
BCF	0,4275	0,0245	0,0602	0,3970	0,8596	0,4090	0,6223
ALH	0,5425	0,9558	0,0004	0,3135	0,1782	0,7772	0,1398
VAP	0,8436	0,2389	0,7630	0,0591	0,9799	0,7613	0,2404
VSL	0,7500	0,2026	0,9267	0,0745	0,8613	0,8425	0,3742
VCL	0,4944	0,4494	0,0068	0,0101	0,8850	0,4736	0,1885
Elong	0,7432	0,0232	0,3844	0,9018	0,0758	0,2435	0,9801
PL	0,2050	0,1355	0,0718	0,5181	0,5294	0,4411	0,4 96
PI	0,2057	0,1362	0,0737	0,5157	0,5253	0,4460	0,4434
AL	0,3961	0,0377	0,1472	0,5441	0,6925	0,5550	0,2748
AI	0,3960	0,0378	0,1504	0,5392	0,6854	0,5498	0,2756
AIPI	0,1120	0,1153	0,0444	0,8855	0,7715	0,9044	0,4434
AIPL	0,4238	0,3999	0,2388	0,4986	0,7941	0,3800	0,7695
ALPI	0,7726	0,9583	0,8969	0,3603	0,6923	0,1801	0,7663
ALPL	0,2319	0,0134	0,1120	0,2830	0,2175	0,6557	0,1776
Potencial alto	0,0469	0,7688	0,0102	0,0371	0,5126	0,6638	0,2515
Potencial inter	0,0003	0,7666	0,2162	0,0058	0,4221	0,7784	0,5432
Potencial baixo	0,4705	0,5938	0,5516	0,6765	0,7835	0,6756	0,6100
SCSA +	0,5259	0,0556	0,4036	0,5229	0,9459	0,5817	0,9856
SCSA -	0,5259	0,0556	0,4036	0,5229	0,9459	0,5817	0,9856

Pot*Dur – Interação Potência*Duração; Pot*Tem – Interação Potência*Tempo; Dur*Tem – Interação Duração*Tempo; Pot*Dur*Tem – Interação Potência*Duração*Tempo; STR – retilinearidade; Linea – linearidade; BCF – frequência de batimento flagelar cruzado; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; VAP – velocidade de trajeto média; VSL – velocidade linear progressiva; VCL – velocidade curvilinear; Elong. – alongação; PL – membrana plasmática lesada; PI – membrana plasmática íntegra; AL – acrossomo lesado; AI – acrossomo íntegro; AIPI – acrossomo íntegro e plasmática íntegra; AIPL – acrossomo íntegro e plasmática lesada; ALPI – acrossomo lesado e plasmática íntegra; ALPL – acrossomo lesado e plasmática lesada; Potencial Inter – potencial intermediário; SCSA+ - positivo ao ensaio da estrutura da cromatina; SCSA- - negativo ao ensaio da estrutura da cromatina

A motilidade visual (Gráfico 1) e o vigor (Gráfico 2) apresentaram interação Potência*Tempo, ou seja, efeito da potência do laser relacionado aos diferentes tempos de análise (PÓS ou FINAL).

Foi observada uma diminuição da motilidade na potência 10 mW ao longo da incubação ($p=0,0074$). Sendo que nas demais potências, inclusive no controle, não houve diferença da motilidade durante a incubação. A motilidade no tempo FINAL nas potências 0, 5 e 7,5 foram superiores à potência 10 mW ($p<0,05$).

Gráfico 1 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da motilidade visual para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL – São Paulo - 2011

O vigor apresentou aumento após a incubação no grupo controle ($p=0,002$), no entanto, o vigor no grupo controle apresentou uma tendência a ser inferior à potência 10 mW imediatamente após o tratamento ($p=0,06$).

Gráfico 2 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) do vigor para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo - 2011

O parâmetro aglutinação apresentou efeito apenas de duração (Gráfico 3), ou seja, as amostras do grupo duração de tratamento 5 minutos apresentaram maior aglutinação espermática do que as amostras do grupo duração de tratamento 10 minutos, independentemente da potência ou do momento de análise (PÓS ou FINAL).

Gráfico 3 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da aglutinação para efeito duração - São Paulo - 2011

Com relação à motilidade progressiva (Gráfico 4), que representa a porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo houve tendência para interação Potência*Duração do Tratamento.

A motilidade progressiva no grupo controle apresentou tendência a ser superior com 5 minutos de duração quando comparada ao tratamento de mesma duração na potência 7,5 mW ($p=0,084$). No entanto, o tratamento com 7,5 mW por 5 minutos de duração apresentou motilidade inferior no tratamento nas potências 5 mW ou 7,5 mW por 10 minutos de duração ($p=0,034$ e $p=0,0318$, respectivamente).

Gráfico 4 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da motilidade progressiva para interação Potência*Duração. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7,5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento de 5 minutos; d10 duração de tratamento de 10 minutos - São Paulo - 2011

Na análise espermática computadorizada, a BCF (frequência de batimento flagelar cruzado), que corresponde ao número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento, apresentou efeito de duração de tratamento e uma tendência para tempo (Gráficos 5 e 6). Sendo maior no grupo duração do tratamento 5 minutos e no tempo FINAL de análise. No entanto, os valores de BCF foram independentes da potência do laser aplicada.

Gráfico 5 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) para efeito duração do tratamento - São Paulo - 2011

Gráfico 6 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) para efeito Tempo - São Paulo - 2011

O parâmetro ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça) apresentou efeito de tempo (Gráfico 7), sendo inferior na avaliação do tempo pós-incubação (PÓS).

Gráfico 7 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da amplitude de deslocamento lateral da cabeça para o efeito Tempo pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo - 2011

Os parâmetros VAP (velocidade de trajeto média) (Gráfico 8) e VSL (velocidade linear progressiva) apresentaram tendência, para a interação Potência*Duração do tratamento (Gráfico 9). Estas tendências demonstram, no grupo controle com 10 minutos de duração, médias inferiores ao tratamento potência 7,5 mW por 5 minutos de duração ($p=0,0714$), porém superiores ao tratamento potência 10 mW por 5 minutos de duração ($p=0,097$). Já a potência 5 mW por 5 minutos foi inferior à de 7,5 mW por 5 minutos ($p=0,089$).

Gráfico 8 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade de trajeto média (VAP) para interação Potência*Duração de tratamento. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7,5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo - 2011

Gráfico 9 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade linear progressiva (VSL) para interação Potência*Duração. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7,5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo - 2011

A VCL (velocidade curvilínea) apresentou efeito de tempo (Gráfico 10) e interação Potência*Duração (Gráfico 11). Esta velocidade apresentou diminuição entre o tempo PÓS de análise e o tempo FINAL, independente da potência. Na interação Potência*Duração apresentou diminuição também conforme o aumento da duração do tratamento no grupo controle ($p=0,014$). A VCL no grupo controle com 5 minutos de tratamento apresentou tendência a ser superior a VCL com 10 mW de potência e 5 minutos de duração de tratamento ($p=0,058$). No entanto, tratamento laser por 10 minutos com 10 mW de potência foi superior à 5 minutos no grupo controle ($p=0,014$).

Gráfico 10 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade de curvilínea (VCL) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; Final – tempo de análise FINAL - São Paulo - 2011

Gráfico 11 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da velocidade curvilínea (VCL) para interação Potência*Duração do tratamento. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7,5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo - 2011

Observou-se efeito de duração e tendência para interação Potência*Tempo no formato da cabeça dos espermatozoides, representado por Elong. Em relação à duração do

tratamento (Gráfico 12), as células espermáticas apresentaram-se menos alongadas no grupo com 10 minutos de tratamento.

Gráfico 12 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da alongação das células (Elong) para efeito duração - São Paulo - 2011

Com relação à interação Potência*Tempo (Gráfico 13), o grupo controle apresentou alongamento da cabeça dos espermatozóides (Elong) durante a incubação ($p < 0,001$), no entanto, a potência 10 mW apresentou diminuição desta característica durante o período ($p = 0,018$) e a potência 5mW uma tendência a apresentá-la ($p = 0,0798$). O padrão de alongamento da cabeça dos espermatozóides do tempo FINAL de análise foi superior com 7,5mW de potência quando comparado ao tempo FINAL do grupo controle ($p = 0,040$).

Gráfico 13 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da alongação das células (Elong) para interação Potência*Tempo. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; pós – análise tempo PÓS; final – análise tempo FINAL - São Paulo - 2011

A integridade/lesão da membrana plasmática demonstrou tendência para efeito de tempo (Gráfico 14), com diminuição da integridade de membrana no tempo FINAL (Gráfico 15), independente da aplicação ou não do laser

Gráfico 14 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da lesão de membrana plasmática (PL) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; Final – tempo de análise FINAL - São Paulo - 2011

Gráfico 15 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da integridade de membrana plasmática (PI) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; Final – tempo de análise FINAL - São Paulo - 2011

Houve efeito da duração do tratamento na integridade de membrana acrossomal (Gráfico 16 e 17), no qual o grupo 10 minutos de tratamento apresentou maior integridade com relação aos 5 minutos, independente da aplicação do laser.

Gráfico 16- Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da lesão de acrossomo (AL) para efeito duração - São Paulo - 2011

Gráfico 17 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da integridade de acrossomo (AI) para efeito duração - São Paulo - 2011

Na análise associada (Gráfico 18 e 19), maior porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras também foi observada no grupo com 10 minutos tratamento. No entanto, todas estas alterações ocorreram independentemente da aplicação e da potência do laser.

Gráfico 18 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das membranas acrossomal e plasmática lesadas (ALPL) para efeito duração - São Paulo - 2011

Gráfico 19 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das membranas acrossomal e plasmática íntegras (AIPI) para efeito duração - São Paulo - 2011

Na análise de potencial de membrana mitocondrial, que avalia o metabolismo energético do espermatozóide, foi observado efeito do tempo, demonstrado pelo aumento da população de alto potencial de membrana mitocondrial, após o tratamento (incubação/irradiação) (Gráfico 20).

Gráfico 20 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com alto potencial de membrana mitocondrial (Alto) para efeito Tempo. Pós – tempo de análise PÓS; FINAL – tempo de análise FINAL - São Paulo - 2011

Observou-se também que esta mesma população (alto potencial), apresentou interação Potência*Duração de tratamento (Gráfico 21), sendo que na potência de 10mW a duração de 10 minutos apresentou resultados inferiores ao 10mW por 5 minutos de duração ($p=0,035$). A potência de 10 mW por 5 minutos de duração também apresentou tendência a ser superior à potência 7,5 mW na duração de 5 minutos ($p=0,0699$) e foi inferior à duração de 10 minutos de tratamento com a potência 7,5 mW ($p=0,034$). A duração do tratamento por 10 minutos no grupo controle apresentou tendência a ser superior na duração do tratamento por 5 minutos de tratamento com 5 mW de potência ($p=0,0947$).

Gráfico 21 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com alto potencial de membrana mitocondrial (Alto) para interação Potência*Duração do tratamento. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo - 2011

Na população com potencial intermediário foi observada a mesma interação de Potência*Duração do tratamento (Gráfico 22). O grupo controle (incubação) com 10 minutos de tratamento apresentou tendência a ser inferior ao grupo tratado com 5 mW por 5 minutos ($p=0,0947$) e foi também inferior ao grupo tratado com 10 mW por 10 minutos ($p=0,0235$). O grupo tratado por 5 minutos com potência de 10 mW foi inferior ao grupo tratado por 5 minutos com potência de 7,5 mW ($p=0,033$), apresentando tendência a ser inferior ao tratado por 10 minutos com potência de 7,5 mW ($p=0,0699$).

Gráfico 22 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (Intermediário) para interação Potência*Duração. p0 – Potência 0 mW; p5 – Potência 5 mW; p7.5 – Potência 7,5 mW; p10 – Potência 10 mW; d5 – duração de tratamento 5 minutos; d10 – duração de tratamento 10 minutos - São Paulo - 2011

A análise do SCSA apresentou efeito de duração do tratamento (Gráfico 23 e 24), na qual o grupo 10 minutos apresentou menor positividade, ou seja, menor alteração de cromatina quando comparado ao grupo 5 minutos de tratamento. Porém este efeito de duração de tratamento foi independente da potência.

Gráfico 23 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das células positivas do ensaio da estrutura da cromatina (SCSA positivo) para efeito duração do tratamento. - São Paulo – 2011

Gráfico 24 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) das células negativas do ensaio da estrutura da cromatina (SCSA negativo) para efeito duração do tratamento

Para melhor compreensão dos eventos biológicos ocorridos, o comportamento das amostras nos parâmetros espermáticos que apresentaram mesma interação, foi estudado agrupadamente. As médias e erro padrão das médias ($\pm$ EPM) dos atributos espermáticos que apresentaram interação estão apresentados agrupadas por potência dentro de cada interação nos gráficos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32.

Gráfico 25 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 0 mW nas durações do tratamento de 5 e 10 minutos para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo - 2011

Gráfico 26 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 5 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo - 2011

Gráfico 27 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 7,5 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo - 2011

Gráfico 28 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 10 mW nas durações de 5 e 10 minutos de tratamento para a motilidade progressiva (Prog), velocidade média de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), população de alto potência de membrana mitocondrial (alto), população com potencial de membrana mitocondrial intermediário (inter) - São Paulo - 2011

Gráfico 29 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 0 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo – 2011

Gráfico 30 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 5 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo - 2011

Gráfico 31 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 7,5 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo - 2011

Gráfico 32 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) da potência 10 mW, imediatamente após a aplicação do tratamento (PÓS) e após 30 minutos do início do tratamento para a motilidade visual (Mot), vigor e alongação das células (Elong) - São Paulo - 2011

6.2 EXPERIMENTO 2

Os atributos seminais foram analisados com relação aos efeitos de tratamento (tratado ou controle), de tempo (T0, T10 e T30) e interação Tratamento*Tempo, pela análise de variância com medidas repetidas no tempo.

Os valores de p encontrados na análise de variância, para os atributos espermáticos analisados, nas amostras seminais submetidas à aplicação de ondas eletromagnéticas (tratado), ou incubadas a 37°C (controle), utilizadas na produção de embriões *in vitro*, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de P para os efeitos tratamento, tempo e tratamento*tempo para os parâmetros espermáticos analisados - São Paulo – 2011

Parâmetro\Efeito	Tratamento	Tempo	Tratamento*Tempo
Motilidade	0.380	0.196	0.713
Vigor	0.014	<0.0001	0.200
Aglutinação	0.245	0.172	0.260
PI	0.637	0.001	0.945
PL	0.630	0.001	0.943
AI	0.985	0.003	0.975
AL	0.976	0.003	0.979
AIPI	0.746	0.008	0.661
AIPL	0.557	0.598	0.399
ALPI	0.778	0.503	0.293
ALPL	0.517	0.092	0.356
Potencial alto	0.102	0.335	0.280
Potencial intermediário	0.140	0.362	0.366
Potencial baixo	0.987	0.048	0.999
SCSA positivo	0.170	0.038	0.614
SCSA negativo	0.167	0.038	0.609

PL – membrana plasmática lesada; PI – membrana plasmática íntegra; AL – acrossomo lesado; AI – acrossomo íntegro; AIPI – acrossomo íntegro e plasmática íntegra; AIPL – acrossomo íntegro e plasmática lesada; ALPI – acrossomo lesado e plasmática íntegra; ALPL – acrossomo lesado e plasmática lesada; SCSA+ - positivo ao ensaio da estrutura da cromatina; SCSA- - negativo ao ensaio da estrutura da cromatina

A análise de variância demonstrou efeito de tratamento apenas para o vigor. Efeito de tempo foi demonstrado para os parâmetros vigor, PL, AL, AIPI, AIPL, ALPI, baixo potencial

de membrana mitocondrial, positividade ou negatividade ao SCSA. Foi observada uma tendência do efeito tempo para o parâmetro ALPL. E não se observou efeito de interação para nenhum dos parâmetros avaliados.

As médias, o erro padrão da média ($\pm$ EPM) e o valor de p para efeito de tratamento, do grupo tratado (laser) e grupo controle (incubação) estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Médias e erro padrão da média ($\pm$ EPM) dos grupos tratado e controle, nos atributos espermáticos analisados e respectivos valores de P para o efeito de tratamento - São Paulo – 2011

Parâmetro	Tratado	Controle	P valor
Motilidade(%)	57.50 $\pm$ 5.24	58.85 $\pm$ 5.24	0.380
Vigor (0-5)	3.10 $\pm$ 0.08	3.24 $\pm$ 0.08	0.014
Aglutinação(0-3)	0.91 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.11	0.245
PI(%)	50.14 $\pm$ 2.73	50.49 $\pm$ 2.73	0.637
PL(%)	49.86 $\pm$ 2.73	49.51 $\pm$ 2.73	0.630
AI(%)	60.02 $\pm$ 2.60	60.03 $\pm$ 2.60	0.985
AL(%)	39.98 $\pm$ 2.60	39.96 $\pm$ 2.60	0.976
AIPI(%)	41.85 $\pm$ 2.95	42.16 $\pm$ 2.95	0.746
AIPL(%)	18.41 $\pm$ 1.61	17.87 $\pm$ 1.61	0.557
ALPI(%)	8.50 $\pm$ 0.79	8.32 $\pm$ 0.79	0.778
ALPL(%)	31.03 $\pm$ 2.38	31.64 $\pm$ 2.38	0.517
Alto(%)	37.36 $\pm$ 2.62	39.29 $\pm$ 2.62	0.102
Intermediário(%)	37.91 $\pm$ 2.37	35.95 $\pm$ 2.37	0.140
Baixo(%)	24.68 $\pm$ 2.87	24.71 $\pm$ 2.87	0.987
SCSA+(%)	1.27 $\pm$ 0.29	1.77 $\pm$ 0.29	0.170
SCSA-(%)	98.73 $\pm$ 0.29	98.23 $\pm$ 0.29	0.167

PL – membrana plasmática lesada; PI – membrana plasmática íntegra; AL – acrossomo lesado; AI – acrossomo íntegro; AIPI – acrossomo íntegro e plasmática íntegra; AIPL – acrossomo íntegro e plasmática lesada; ALPI – acrossomo lesado e plasmática íntegra; ALPL – acrossomo lesado e plasmática lesada; Alto – alto potencial de membrana mitocondrial; Intermediário – potencial intermediário de membrana mitocondrial; Baixo – baixo potencial de membrana mitocondrial; (SCSA+) - positivo ao ensaio da estrutura da cromatina; (SCSA-) - negativo ao ensaio da estrutura da cromatina.

Foi observado efeito da aplicação de laser sobre o vigor das amostras seminais utilizadas na produção *in vitro* de embriões, nas quais a aplicação do laser diminui o vigor das amostras seminais.

As médias e o valor de P para o efeito tempo de cada momento de avaliação estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) dos três momentos de análise e valor de P para efeito tempo

Parâmetro\Tempo	T0	T10	T30	P valor
Motilidade(%)	60 $\pm$ 5.29	56.62 $\pm$ 5.29	57.91 $\pm$ 5.29	0.196
Vigor (0-5)	2.86 $\pm$ 0.09	3.17 $\pm$ 0.09	3.49 $\pm$ 0.09	<0.0001
Aglutinação(0-3)	1.01 $\pm$ 0.11	0.86 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.11	0.172
PI(%)	52.07 $\pm$ 2.76	50.45 $\pm$ 2.76	48.42 $\pm$ 2.76	0.001
PL(%)	47.93 $\pm$ 2.75	49.56 $\pm$ 2.75	51.57 $\pm$ 2.75	0.001
AI(%)	61.42 $\pm$ 2.62	59.84 $\pm$ 2.62	58.82 $\pm$ 2.62	0.003
AL(%)	38.57 $\pm$ 2.62	40.18 $\pm$ 2.62	41.17 $\pm$ 2.62	0.003
AIPI(%)	43.93 $\pm$ 2.98	42.06 $\pm$ 2.98	40.02 $\pm$ 2.98	0.0008
AIPL(%)	17.85 $\pm$ 1.67	17.77 $\pm$ 1.67	18.79 $\pm$ 1.67	0.598
ALPI(%)	7.98 $\pm$ 0.85	8.86 $\pm$ 0.85	8.40 $\pm$ 0.85	0.503
ALPL(%)	30.31 $\pm$ 2.43	30.91 $\pm$ 2.43	32.77 $\pm$ 2.43	0.092
Alto(%)	39.15 $\pm$ 2.68	38.69 $\pm$ 2.68	37.14 $\pm$ 2.68	0.335
Intermediário(%)	38.24 $\pm$ 2.46	36.48 $\pm$ 2.46	36.08 $\pm$ 2.46	0.362
Baixo(%)	22.51 $\pm$ 2.95	24.80 $\pm$ 2.95	26.78 $\pm$ 2.95	0.048
SCSA+(%)	1.04 $\pm$ 0.34	1.35 $\pm$ 0.34	2.16 $\pm$ 0.34	0.038
SCSA-(%)	98.96 $\pm$ 0.34	98.64 $\pm$ 0.34	97.84 $\pm$ 0.34	0.038

T0 – tempo de análise 0 minutos (imediatamente antes do tratamento); T10 – tempo de análise 10 minutos (imediatamente pós-tratamento); T30 – tempo de análise 30 minutos (30 minutos após o início do tratamento); PL – membrana plasmática lesada; PI – membrana plasmática íntegra; AL – acrossomo lesado; AI – acrossomo íntegro; AIPI – acrossomo íntegro e plasmática íntegra; AIPL – acrossomo íntegro e plasmática lesada; ALPI – acrossomo lesado e plasmática íntegra; ALPL – acrossomo lesado e plasmática lesada; Alto – alto potencial de membrana mitocondrial; Intermediário – potencial intermediário de membrana mitocondrial; Baixo – baixo potencial de membrana mitocondrial; (SCSA+) - positivo ao ensaio da estrutura da cromatina; (SCSA-) - negativo ao ensaio da estrutura da cromatina.

Os parâmetros vigor, PL, AL, AIPI, AIPL, ALPI, baixo potencial de membrana mitocondrial, positividade ou negatividade ao SCSA apresentaram efeito de tempo, independente do tratamento utilizado.

As médias dos tratamentos em cada momento de análise estão demonstradas na tabela 5, juntamente com o valor de P para a interação Tratamento*Tempo.

Tabela 5 - Média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) do grupo tratado e controle nos três momentos de análise e o valor de P para a interação Tratamento*Tempo - São Paulo – 2011

Parâmetro	T0	Tratado T10	Controle T10	Tratado T30	Controle T30	P Valor
Motilidade(%)	60 $\pm$ 5.45	55.11 $\pm$ 5.45	58.12 $\pm$ 5.45	57.40 $\pm$ 5.45	58.42 $\pm$ 5.45	0.713
Vigor (0-5)	2.86 $\pm$ 0.01	3.06 $\pm$ 0.10	3.27 $\pm$ 0.10	3.40 $\pm$ 0.10	3.58 $\pm$ 0.10	0.200
Aglutinação(0-3)	1.01 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.13	1.11 $\pm$ 0.13	0.260
PI(%)	52.07 $\pm$ 2.83	50.19 $\pm$ 2.83	50.71 $\pm$ 2.83	48.16 $\pm$ 2.83	48.69 $\pm$ 2.83	0.945
PL(%)	57.93 $\pm$ 2.83	49.83 $\pm$ 2.83	49.29 $\pm$ 2.83	51.83 $\pm$ 2.83	51.30 $\pm$ 2.83	0.943
AI(%)	61.42 $\pm$ 2.67	59.91 $\pm$ 2.67	59.76 $\pm$ 2.67	58.73 $\pm$ 2.67	58.90 $\pm$ 2.67	0.975
AL(%)	38.57 $\pm$ 2.67	40.12 $\pm$ 2.67	40.24 $\pm$ 2.67	41.26 $\pm$ 2.67	41.08 $\pm$ 2.67	0.979
AIPI(%)	44.69 $\pm$ 3.10	42.05 $\pm$ 3.10	42.07 $\pm$ 3.10	40.32 $\pm$ 3.10	39.73 $\pm$ 3.10	0.661
AIPL(%)	16.74 $\pm$ 1.85	17.85 $\pm$ 1.85	17.69 $\pm$ 1.85	18.41 $\pm$ 1.85	19.17 $\pm$ 1.85	0.399
ALPI(%)	7.38 $\pm$ 1.00	9.07 $\pm$ 1.00	8.64 $\pm$ 1.00	7.84 $\pm$ 1.00	8.96 $\pm$ 1.00	0.293
ALPL(%)	31.19 $\pm$ 2.56	30.23 $\pm$ 2.56	31.60 $\pm$ 2.56	33.42 $\pm$ 2.56	32.12 $\pm$ 2.56	0.356
Alto(%)	39.15 $\pm$ 2.86	36.47 $\pm$ 2.86	40.92 $\pm$ 2.86	36.47 $\pm$ 2.86	37.79 $\pm$ 2.86	0.280
Intermediário(%)	38.24 $\pm$ 2.70	38.71 $\pm$ 2.70	34.25 $\pm$ 2.70	36.78 $\pm$ 2.70	35.28 $\pm$ 2.70	0.366
Baixo(%)	22.51 $\pm$ 3.17	24.80 $\pm$ 3.17	24.80 $\pm$ 3.17	26.74 $\pm$ 3.17	26.81 $\pm$ 3.17	0.999
SCSA+(%)	1.04 $\pm$ 0.46	0.96 $\pm$ 0.46	1.75 $\pm$ 0.46	1.81 $\pm$ 0.46	2.51 $\pm$ 0.46	0.614
SCSA-(-%)	98.96 $\pm$ 0.46	99.04 $\pm$ 0.46	98.24 $\pm$ 0.46	98.18 $\pm$ 0.46	97.49 $\pm$ 0.46	0.609

T0 – tempo de análise 0 minutos (imediatamente antes do tratamento); T10 – tempo de análise 10 minutos (imediatamente pós-tratamento); T30 – tempo de análise 30 minutos (30 minutos após o início do tratamento); PL – membrana plasmática lesada; PI – membrana plasmática íntegra; AL – acrossomo lesado; AI – acrossomo íntegro; AIPI – acrossomo íntegro e plasmática íntegra; AIPL – acrossomo íntegro e plasmática lesada; ALPI – acrossomo lesado e plasmática íntegra; ALPL – acrossomo lesado e plasmática lesada; Alto – alto potencial de membrana mitocondrial; Intermediário – potencial intermediário de membrana mitocondrial; Baixo – baixo potencial de membrana mitocondrial; (SCSA+) - positivo ao ensaio da estrutura da cromatina; (SCSA-) - negativo ao ensaio da estrutura da cromatina

Não foi observada interação Tratamento*Tempo em nenhum dos atributos avaliados.

Após análise das imagens do ensaio cometa alcalino (Figura 6), os parâmetros quantificados pelo software Comet ScoreTM (Figuras 7 e 8) foram submetidos à análise de variância. Os valores de p encontrados para o efeito de tratamento, tempo e a interação Tratamento*Tempo estão apresentados na tabela 6.

Figura 6 - Microscopia de epifluorescência do ensaio cometa alcalino (aumento de 200X coloração sonda fluorescente Syber Green). **A**: espermatozoides com DNA íntegro (ausência de cauda e cabeça intensa); **B**: espermatozoides com fragmentação discreta (presença de cauda discreta e cabeça intensa); **C**: espermatozoides com fragmentação moderada (presença de cauda expressiva e cabeça com intensidade moderada) **D**: espermatozoides com fragmentação elevada (presença de cauda expressiva, e cabeça com baixa intensidade) - São Paulo - 2011

Figura 7 - Imagem ilustrativa dos parâmetros quantificados pelo software Comet ScoreTM.

Figura 8 - Imagem de microscopia de epifluorescência submetida a quantificação no software Comet Score™.

Tabela 6 - Valores de p para os efeitos tratamento, tempo e tratamento*tempo para os parâmetros do ensaio cometa alcalino - São Paulo – 2011

Parâmetro\Efeito	Tratamento	Tempo	Tratamento*Tempo
Comprimento cometa(px)	0.762	0.127	0.687
Altura cometa(px)	0.417	0.277	0.541
Área cometa(px)	0.998	0.528	0.884
Intensidade cometa(px)	0.913	0.836	0.693
Intensidade média cometa(px)	0.974	0.265	0.991
Diâmetro cabeça(px)	0.406	0.002	0.833
Área cabeça(px)	0.864	0.987	0.958
Intensidade cabeça(px)	0.564	0.831	0.919
Intensidade média da cabeça	0.708	0.770	0.965
DNA cabeça(%)	0.333	0.300	0.298
Comprimento cauda(px)	0.804	0.166	0.676
Área cauda(px)	0.441	0.104	0.496
Intensidade cauda(px)	0.348	0.187	0.219
Intensidade média cauda(px)	0.354	0.251	0.796
DNA cauda(%)	0.335	0.302	0.296

No ensaio cometa alcalino encontrou-se apenas efeito de tempo para o diâmetro da cabeça do cometa, este efeito foi independente do tratamento (laser ou incubação).

As médias encontradas para cada tratamento estão apresentadas na tabela 7. Já as médias de cada momento de análise no ensaio cometa alcalino estão descritas na tabela 8.

Tabela 7 - Média $\pm$ EPM do grupo tratado e controle para o ensaio cometa alcalino e valores de p para o efeito de tratamento - São Paulo - 2011

Parâmetro	Tratado	Controle	P valor
Comprimento cometa(px)	382.33 $\pm$ 36.49	375.31 $\pm$ 36.49	0.762
Altura cometa(px)	144.12 $\pm$ 7.26	140.59 $\pm$ 7.26	0.417
Área cometa(px)	42844 $\pm$ 5693	42852 $\pm$ 5693	0.998
Intensidade cometa(px)	834607 $\pm$ 94901	827530 $\pm$ 94901	0.913
Intensidade média cometa(px)	26.30 $\pm$ 1.54	26.34 $\pm$ 1.54	0.974
Diâmetro cabeça(px)	88.37 $\pm$ 2.84	87.17 $\pm$ 2.84	0.406
Área cabeça(px)	18983 $\pm$ 4158	20664 $\pm$ 4158	0.684
Intensidade cabeça(px)	339555 $\pm$ 39276	364643 $\pm$ 39276	0.564
Intensidade média da cabeça	28.75 $\pm$ 2.25	28.06 $\pm$ 2.25	0.708
DNA cabeça(%)	56.51 $\pm$ 3.42	54.39 $\pm$ 3.42	0.333
Comprimento cauda(px)	293.85 $\pm$ 36.44	288.20 $\pm$ 36.44	0.804
Área cauda(px)	23850 $\pm$ 2731	22188 $\pm$ 2731	0.441
Intensidade cauda(px)	494891 $\pm$ 63293	462887 $\pm$ 63293	0.348
Intensidade média cauda(px)	79.03 $\pm$ 16.84	55.59 $\pm$ 16.84	0.354
DNA cauda(%)	45.59 $\pm$ 3.42	43.49 $\pm$ 3.42	0.335

Tabela 8 - Média $\pm$ EPM dos momentos de análise do ensaio cometa alcalino e valor de P para o efeito de tempo
- São Paulo – 2011

Parâmetro	T0	T10	T30	P valor
Comprimento cometa(px)	364.49 $\pm$ 38.27	412.78 $\pm$ 38.27	359.19 $\pm$ 38.27	0.127
Altura cometa (px)	146.03 $\pm$ 7.57	143.41 $\pm$ 7.57	137.63 $\pm$ 7.57	0.277
Área cometa (px)	43492 $\pm$ 6099	45528 $\pm$ 6099	39524 $\pm$ 6099	0.528
Intensidade cometa (px)	821921 $\pm$ 100217	857932 $\pm$ 100217	813353 $\pm$ 100217	0.836
Intensidade média cometa (px)	2717 $\pm$ 1.66	24.89 $\pm$ 1.66	26.90 $\pm$ 1.66	0.265
Diâmetro cabeça (px)	84.28 $\pm$ 2.93	90.95 $\pm$ 2.93	88.03 $\pm$ 2.93	0.002
Área cabeça(px)	20262 $\pm$ 4636	19741 $\pm$ 4636	19467 $\pm$ 4636	0.987
Intensidade cabeça (px)	349853 $\pm$ 44827	337242 $\pm$ 44827	369204 $\pm$ 44827	0.831
Intensidade média da cabeça	28.46 $\pm$ 2.44	27.56 $\pm$ 2.44	29.20 $\pm$ 2.44	0.770
DNA cabeça(%)	55.83 $\pm$ 3.59	53.21 $\pm$ 3.59	57.31 $\pm$ 3.59	0.300
Comprimento cauda (px)	2 $\pm$ 38.17	321.65 $\pm$ 38.17	271.22 $\pm$ 38.17	0.166
Área cauda (px)	23230 $\pm$ 2933	25770 $\pm$ 2933	20057 $\pm$ 2933	0.104
Intensidade cauda (px)	472068 $\pm$ 65508	520450 $\pm$ 65508	444149 $\pm$ 65508	0.187
Intensidade média cauda (px)	48.79 $\pm$ 20.97	56.25 $\pm$ 20.97	96.89 $\pm$ 20.97	0.251
DNA cauda(%)	44.16 $\pm$ 3.59	46.78 $\pm$ 3.59	42.68 $\pm$ 3.59	0.302

O diâmetro da cabeça do cometa apresentou aumento em T10 seguido de uma diminuição em T30.

As médias do ensaio cometa alcalino para cada tratamento, em cada momento de análise encontram-se apresentadas na tabela 9, juntamente com o valor de p para a interação Tratamento*Tempo.

Tabela 9 - Médias $\pm$ EPM dos grupos tratado e controle, nos três momentos de análise (T0, T10 e T30) e valores de P para a interação Tratamento*Tempo - São Paulo - 2011

Parâmetro	T0	Tratado T10	Controle T10	Tratado T30	Controle T30	P valor
Comprimento cometa(px)	364.49 $\pm$ 43.20	406.10 $\pm$ 43.20	419.46 $\pm$ 43.20	376.41 $\pm$ 43.20	341.97 $\pm$ 43.20	0.687
Altura cometa(px)	146.03 $\pm$ 8.44	143.54 $\pm$ 8.44	143.28 $\pm$ 8.44	142.80 $\pm$ 8.44	132.46 $\pm$ 8.44	0.541
Área cometa(px)	43492 $\pm$ 7181	44191 $\pm$ 7181	46865 $\pm$ 7181	40850 $\pm$ 7181	38199 $\pm$ 7181	0.884
Intensidade cometa(px)	821921 $\pm$ 114694	829458 $\pm$ 114694	886407 $\pm$ 114694	852444 $\pm$ 114694	774262 $\pm$ 114694	0.693
Intensidade média cometa(px)	2717 $\pm$ 1.97	24.96 $\pm$ 1.97	24.82 $\pm$ 1.97	26.77 $\pm$ 1.97	27.03 $\pm$ 1.97	0.991
Diâmetro cabeça(px)	84.28 $\pm$ 3.19	91.97 $\pm$ 3.19	89.93 $\pm$ 3.19	88.84 $\pm$ 3.19	87.22 $\pm$ 3.19	0.833
Área cabeça(px)	20262 $\pm$ 5839	18526 $\pm$ 5839	20955 $\pm$ 5839	18161 $\pm$ 5839	20774 $\pm$ 5839	0.958
Intensidade cabeça(px)	349853 $\pm$ 58395	318517 $\pm$ 58395	355966 $\pm$ 58395	350296 $\pm$ 58395	388111 $\pm$ 58395	0.680
Intensidade média da cabeça	28.46 $\pm$ 2.92	27.06 $\pm$ 2.92	28.06 $\pm$ 2.92	28.65 $\pm$ 2.92	29.74 $\pm$ 2.92	0.965
DNA cabeça(%)	55.83 $\pm$ 4.04	53.50 $\pm$ 4.04	52.91 $\pm$ 4.04	53.85 $\pm$ 4.04	60.77 $\pm$ 4.04	0.298
Comprimento cauda(px)	280.22 $\pm$ 42.93	313.80 $\pm$ 42.93	329.50 $\pm$ 42.93	287.56 $\pm$ 42.93	254.87 $\pm$ 42.93	0.676
Área cauda(px)	23230 $\pm$ 3468	25630 $\pm$ 3468	25909 $\pm$ 3468	22688 $\pm$ 3468	17425 $\pm$ 3468	0.496
Intensidade cauda(px)	472068 $\pm$ 71732	510459 $\pm$ 71732	530441 $\pm$ 71732	502148 $\pm$ 71732	386151 $\pm$ 71732	0.219
Intensidade média cauda(px)	48.79 $\pm$ 30.14	75,87 $\pm$ 30.14	36,64 $\pm$ 30.14	112.43 $\pm$ 30.14	81.35 $\pm$ 30.14	0.796
DNA cauda(%)	44.16 $\pm$ 4.04	46.47 $\pm$ 4.04	47.08 $\pm$ 4.04	46.14 $\pm$ 4.04	39.22 $\pm$ 4.04	0.180

As taxas de produção *in vitro* de embriões foram analisadas com relação às médias obtidas quando se utilizou na fecundação *in vitro*, sêmen submetido à aplicação de ondas eletromagnéticas (tratado) ou incubado à 37°C (controle). Tanto as médias dos grupos, quanto o valor de p encontrado no teste T estão sumarizados na tabela 10.

Tabela 10 - Médias $\pm$ EPM das taxas de produção *in vitro* de embriões dos grupos tratado (laser), controle e o valor de P - São Paulo - 2011

Variável	Tratado	Controle	P valor
Taxa de clivagem	43,5 $\pm$ 2,4	40,2 $\pm$ 3,8	0,46
Taxa de blastocisto D6	2,6 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 1,0	0,84
Taxa de blastocisto D7	6,6 $\pm$ 1,0	6,3 $\pm$ 1,4	0,88
Taxa de blastocisto D9	4,3 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 1,2	0,54
Taxa de blastocisto D12	1,3 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3	0,40
Taxa de blastocisto total	5,7 $\pm$ 1,2	6,2 $\pm$ 1,4	0,75
Taxa de bloqueio	87,8 $\pm$ 2,1	85,6 $\pm$ 2,9	0,55

Não foram observadas diferenças significativas nas taxas da produção *in vitro* de embriões, quando utilizado sêmen do grupo controle ou sêmen do grupo tratado (submetido às ondas eletromagnéticas).

Os resultados da avaliação do ensaio TUNEL, dos embriões produzidos *in vitro* estão apresentados na tabela 11 e na Figura 9.

Tabela 11 - Médias $\pm$ EPM das avaliações embrionárias e o valor de P – São Paulo - 2011

Variável	Tratado (n=7)	Controle (n=8)	P valor
Blastômero Fragmentados(%)	16,0 $\pm$ 3,8	13,0 $\pm$ 3,0	0,53
Blastômeros Totais	178,5 $\pm$ 37	121,1 $\pm$ 19,6	0,17

Figura 9 - Microscopia de epifluorescência de embriões submetidos ao ensaio TUNEL. **A:** Controle Negativo (filtro DAPI); **B:** Controle Negativo (filtro FITC); **C:** Controle Positivo (filtro DAPI); **D:** Controle Positivo (filtro FITC); **E:** Embrião analisado (filtro DAPI); **F:** Embrião analisado (filtro FITC) – São Paulo - 2011

Na avaliação embrionária pelo ensaio TUNEL, não houve efeito do tratamento na porcentagem de blastômeros com fragmentação de DNA ou no número de blastômeros totais.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O resultado deste trabalho permitiu observar efeitos com relação à duração do tratamento, ao tempo de análise, às interações Potência*Duração do tratamento e Potência*Tempo.

O efeito isolado da duração do tratamento e do tempo de análise, ou seja, sem a interação destas variáveis com a variável potência, demonstrou que nestes parâmetros, independentes da potência aplicada, as amostras apresentaram o mesmo comportamento, logo este fenômeno ocorre de maneira similar ao grupo controle. Estes dados sugerem que o efeito está no tempo de incubação, independente deste ser na ausência de laser (grupo controle) ou na presença de potências distintas de ondas eletro magnéticas (grupo tratado). Este fato sugere que nesta fase de incubação pós-preparação da amostra, ou seja, pós-descongelamento e centrifugação, a célula espermática pode estar em fase de adaptação e de recuperação das alterações adquiridas durante a manipulação. Estas alterações já foram relatadas por Fraser (2010) e Watson (1995), que caracterizaram, respectivamente, uma pré-capacitação espermática induzida pela centrifugação e/ou criopreservação do sêmen. Esta recuperação, provavelmente consiste de uma reorganização dos lipídios de membranas e do metabolismo energético, que pode ser prejudicada pela manipulação destas células neste momento crítico.

Esta hipótese explicaria a diminuição da aglutinação, da lesão da membrana acrossomal e da fragilidade da cromatina, além de alterações no formato das células e no padrão de motilidade dos espermatozoides durante o tratamento com 10 minutos de duração. Já no tratamento com 5 minutos de duração, as células parecem ainda estar neste período crítico de adaptação e recuperação, justificando o efeito negativo da manipulação do sêmen, neste momento.

Os resultados do efeito de tempo de análise (tempo PÓS e FINAL) confirmam estas alterações induzidas pela criocapacitação e centrifugação do sêmen, como alterações no padrão da motilidade e aumento do alto potencial de membrana mitocondrial. Estes associados aos resultados para o efeito de duração de tratamento sugerem uma ordem temporal dos fatores. Ou seja, após um curto período de análise, pôde ser observada, entre 5 e 10 minutos, a reorganização das membranas. Já o restabelecimento do metabolismo energético e as alterações de motilidade, como diminuição de ALH e VCL, que são altos quando

relacionados à hiperativação (Shahar et al., 2011), ficam evidentes após 30 minutos de processamento.

Também aos 30 minutos foi possível detectar um aumento da lesão da membrana plasmática sugerindo o início do efeito negativo do tempo na viabilidade espermática. Curiosamente, percebe-se uma cinética dos acontecimentos, na qual as alterações de membranas celulares precedem as alterações decorrentes do metabolismo energético.

As interações Potência*Duração do tratamento e Potência*Tempo, encontrados no presente trabalho, corroboram com os dados da literatura, os quais relacionam os parâmetros de irradiação (potência e duração da aplicação) com os efeitos biológicos do laser. No entanto, muitos trabalhos, descrevem outros parâmetros de irradiação, sendo importante discernir quais destes parâmetros apresentam uma real influência nos efeitos biológicos.

A fluência é um parâmetro de irradiação determinada pelo produto da potência e duração do tratamento pela área exposta à irradiação. Porém, não há fundamentos para a relação entre a área exposta ao laser e o efeito biológico, quando, por exemplo, de uma suspensão de células. Talvez este conceito seja herança do estudo dos efeitos biológicos em tecidos, pois nestes, uma maior área de irradiação pode resultar em uma maior quantidade de tecido/células tratadas, aumentando o efeito do laser.

Quando se trabalha com uma suspensão de células, o importante é que toda a superfície a ser tratada receba, de forma homogênea, as ondas eletromagnéticas. Para cumprir esta premissa, neste trabalho foi realizada calibração do sistema óptico de forma que fosse obtida uma frente de ondas eletromagnéticas homogêneas em toda área de exposição. Ao se conseguir esta aplicação homogênea, a área não mais influencia no efeito biológico. No entanto, muitas vezes e dependendo do aparelho, a potência aplicada difere da potência indicada pelo equipamento ou da potência aferida na saída do sistema. Em vista disto, quando estas premissas não são obedecidas, há prejuízo da confiabilidade e da repetibilidade dos resultados.

Como unidade de comparação entre tratamentos, muitos trabalhos utilizam a fluência. Contudo, este parâmetro depende da área exposta à irradiação e a ausência de padronização ou informações incompletas da mesma, torna-se difícil a reprodução e a comparação dos resultados. Ao se utilizar, portanto a fluência, a compreensão dos efeitos biológicos e o estabelecimento da relação destes com os parâmetros de irradiação ficam comprometidos.

No tocante aos efeitos envolvendo a ausência ou a aplicação de laser em diferentes potências houve interação da potência do laser com a duração do tratamento e o tempo de

análise. A análise individual dos resultados deste estudo não é conclusiva. Já ao se analisar o comportamento dos diferentes tratamentos em cada tipo de interação, os efeitos biológicos puderam ser mais bem compreendidos, sendo esta uma ferramenta útil de análise.

Todos os parâmetros de motilidade computadorizada (motilidade progressiva, VAP, VSL e VCL) na interação Potência*Duração do tratamento demonstraram efeito positivo do laser nas potências 5, 7.5 e 10mW, quando maior duração da aplicação (10 minutos). Esta interação fica evidente, pois na ausência de laser (0mW) e incubação por 10 minutos, estes parâmetros apresentam decréscimo. Estes dados sugerem que a interação do efeito da potência do laser com a duração do tratamento na melhora do padrão de motilidade espermática é mais eficiente com a duração 10 minutos, quando da utilização das potências 5, 7.5 e 10 mW. Este efeito segundo Lubart et al. (1992) se justifica, pois o LASER acelera o transporte de cálcio no sêmen bovino, o que pode causar alterações na concentração citoplasmáticas deste íon, e portanto um efeito regulatório no controle da motilidade e na reação acrossomal.

Na atividade mitocondrial avaliada pelo potencial de membrana, a interação Potência*Duração do tratamento foi mais variada. A população de potencial intermediário deve ser avaliada cuidadosamente, uma vez que o aumento desta população não pode ser relacionado com um efeito estimulatório ou inibitório. Isto porque este aumento pode ser originado por uma queda do potencial de membrana da população de alto potencial, originada também pelo aumento do potencial da população de baixo potencial ou a associação destes dois eventos. Portanto, baseando-se no efeito na população de alto potencial (aumento), houve obrigatoriamente um efeito estimulatório da duração sobre a atividade mitocondrial nas potências 5 e 7,5mW. Ou seja, nas potências de 5 e 7.5 mW a maior duração de aplicação do tratamento pode ser mais efetiva na melhora da atividade metabólica do sêmen.

IAFFALDANO et al. (2010) demonstraram o efeito do laser resultando em maior motilidade, maior integridade das membranas plasmática e acrossomal e maior carga de energia em espermatozóides de coelho, corroborando para os resultados encontrados neste trabalho sobre o efeito do laser nos parâmetros de motilidade espermática e metabolismo energético. Estes autores sugerem que o laser afeta a cadeia respiratória mitocondrial pela mudança do potencial de membrana e consequentemente altera a permeabilidade seletiva para o cálcio e outros íons (PASSARELLA et al., 1984). Esta teoria foi comprovada por Shahar et al. (2011) que observaram um rápido aumento do cálcio intracelular e um aumento da hiperativação flagelar após a irradiação LASER, contrariando os resultados deste presente trabalho, no qual foi detectado aumento da velocidade progressiva. Tal contradição se deve à

diferença do tipo de LASER aplicado, potência e duração do tratamento, evidenciando a importância de se padronizar estes parâmetros de acordo com a amostra a ser irradiada.

A interação Potência*Tempo, uma melhora na motilidade e vigor foi observada durante a incubação no grupo controle e na potência de 5 mW. Na potência de 7,5 mW, as amostras parecem não diferir entre as análises PÓS e FINAL, enquanto que na potência de 10 mW há uma possível queda nesta interação.

Os resultados deste estudo indicam uma ação do LASER em atributos relacionados à motilidade espermática. Este efeito do laser ao longo do tempo de incubação nos parâmetros espermáticos já foi demonstrado na literatura. Entre eles, o efeito positivo da manutenção de parâmetros de motilidade espermática como BCF e linearidade ou aumento de BCF, VAP, LIN e STR (CORRAL-BAQUÉS et al., 2005 e 2009) e aumento de BCF (BRANDÃO, 2008), em sêmen canino e equino. Em sêmen de peru, o efeito positivo do laser ao longo do tempo de armazenamento também resultou em uma menor queda na motilidade, além de menor lesão de membrana plasmática (IAFFALDANO et al., 2005). Segundo Corral-Baqués et al., (2005) as alterações no padrão de motilidade se devem a uma via de produção de energia distinta e uma melhor utilização desta, o que torna o processo mais eficiente.

Considerando-se o efeito da duração do tratamento sobre os parâmetros analisados, um melhor desempenho foi observado quando foi aplicada a maior duração de tratamento, para todos os parâmetros significativos com exceção do BCF, associado às interações Potência*Duração e Potência*Tempo. Assim, como na literatura, os resultados neste trabalho apresentaram efeito positivo do laser, sendo que nas condições experimentais adotadas a potência de 5mW sugere ser a mais efetiva. A combinação, potência 5mW por 10 minutos de exposição foi aplicada no sêmen utilizado na produção *in vitro* de embriões no experimento 2.

Com relação à produção *in vitro* de embriões foi observado efeito significativo do tratamento e do tempo, no entanto, não foi observada a interação desses efeitos.

O efeito tempo sobre as análises espermáticas foi independente do tratamento, portanto como discutido anteriormente trata-se de uma variação temporal que ocorre tanto nas amostras irradiadas quando nas incubadas.

O efeito do tratamento (irradiação X incubação) diferiu apenas para o vigor, sendo inferior nas amostras submetidas ao laser. No experimento 1, o vigor apresentou interação Potência*Tempo, no qual as potências 0 e 5mW apresentaram aumento deste atributo ao longo da incubação, diferentemente das demais potências. No entanto, a potência 5 mW não

foi superior ao controle. Portanto, apesar da potência 5 mW também apresentar aumento do vigor ao longo da incubação, causou um prejuízo à amostra.

Na análise das taxas de produção *in vitro* de embriões ou na qualidade embrionária avaliada pelo ensaio TUNEL, não houve diferença significativa com a utilização de sêmen irradiado nas condições experimentais adotadas.

Estes dados sugerem que apesar do efeito do laser de baixa potência ser dependente da potência e da duração do tratamento, nas condições utilizadas, não houve alteração do potencial de fecundação e do efeito paterno no desenvolvimento embrionário inicial. Como podemos observar o efeito biológico do laser provoca alterações em diversos atributos espermáticos simultaneamente. Estas alterações são sugestivas de efeito positivo para determinados atributos, porém negativo para outros dentro de um mesmo padrão de irradiação. Fica difícil determinar quais alterações espermáticas escolher em detrimento de outras. Para a utilização do laser de baixa potência como ferramenta de melhora do potencial de fecundação de amostras seminais, ainda é necessário uma maior elucidação dos efeitos biológicos do laser, da influência dos parâmetros de irradiação e da correlação de atributos espermáticos com a fertilidade.

Baixos índices de produção *in vitro* foram obtidos nas condições experimentais adotadas, tanto para o grupo tratado quanto para o grupo controle. Estes índices são provavelmente decorrentes de alterações do protocolo adotado como, uma baixa dose inseminante, alterações de meios, ausência de técnicas para a seleção das células móveis como percoll e swim up, quando comparado aos protocolos convencionais.

Estas adaptações foram necessárias para possibilitar a utilização do sêmen submetido às ondas eletromagnéticas na produção *in vitro* de embriões, sem que este sofresse algum processamento entre a aplicação e a inseminação dos oócitos na FIV, e também para que o volume e o número de células espermáticas utilizadas no grupo tratado e controle, para os diferentes animais fossem os mesmos. A utilização de metodologias para seleção de células móveis pós-tratamento laser, poderia mascarar o efeito deste pela remoção das células imóveis ou com baixa motilidade que podem se beneficiar dos efeitos positivos do laser na motilidade e na atividade metabólica.

Porém é importante ressaltar que a utilização de uma dose inseminante inferior, proporciona grande aumento na correlação dos atributos espermáticos com a fertilidade (SAACKE et al. 1994). Esta medida visou aumentar o efeito do espermatozóide nas taxas obtidas e ampliar a chance de detectar o efeito deste na fertilidade e de sinalizar possíveis alterações nos atributos espermáticas em decorrência da aplicação das ondas eletromagnéticas.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- 1) O laser de baixa potência apresenta efeito sobre diversos atributos relacionados à viabilidade espermática. Este efeito foi dependente da potência e da duração do tratamento. Nas condições experimentais estabelecidas para este trabalho, o comportamento da potência de 5 mW por 10 minutos de aplicação sugere efeitos positivos na viabilidade espermática.
- 2) Não foi detectada melhora nas taxas da produção *in vitro* de embriões bovinos nem na qualidade destes embriões, quando da utilização do sêmen bovino irradiado com LASER na potência de 5mW por 10 minutos de aplicação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

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

BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R.C. The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 109-115, 1988.

BARD, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v. 15, n. 4, p. 355-367, 2007.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994, p. 253.

BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS I. D.; ERSBOLL A. K.; GREVE T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v.63, p. 1789–1802, 2005.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 1513-1520, 1999.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozóides criopreservados de eqüinos. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

CELEGHINI EC, DE ARRUDA RP, DE ANDRADE AF, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-88, 2007.

CORMIER, N.; SIRARD, M.C.; BAILEY, J. L. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 461-468, 1997

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

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methaloendoprotease activity in penetration on zone-free hamster egg by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988.

DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.

EBNER, T.; MOSER, M.; YAMAN, C.; SOMMERGRUBER, M.; TEWS, G. Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmic injection. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 2, p. 417-418, 2002.

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

ENWEMEKA, C. S. Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanism of action. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 9, p. 333-338, 1988.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; EREPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Teriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 176-188, 2006.

FIRESTONE, R. S.; ESFANDIARI, N.; MOSKOVTSSEV, S. I.; MOSKOVTSSEV, S. I.; BURSTEIN, G. T. V.; LIBRACH, C.; BETOV, Y.; CASPER, R. F. The effects of low-level laser light exposure on sperm motion characteristics and DNA damage. **Journal of Andrology**, 2011. doi: 10.2164/jandrol.111.013458

FORD, W.C.L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human reproduction update**, v.12, n.3, p. 269–274, 2006.
doi:10.1093/humupd/dmi053

FRASER, L.; STRZEZEK, J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 °C and 16 °C. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 42, n. 1, p. 49–55, 2004.

FRASER, L. The “Switching on” of mammalian spermatozoa: Molecular Events Involved in promotion and Regulation of Capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 197-208, 2010.

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

HAMMADEH, M. E.; ASKARI, A. S.; GEORG, T.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 155–62, 1999.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. **Teriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-25, 2006.

HUGHES, C. M.; LEWIS, S. E.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; THOMPSON, W. A. Comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 8, p. 613–619, 1996.

IAFFALDANO, N.; MELUZZI, A.; MANCHISI, A., PASSARELLA, S. Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 317-325, 2005.

IAFFALDANO, I.; ROSATO, M. P.; PAVENTI, G.; PIZZUTO, R.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A.; PASSARELLA, S. The irradiation of rabbit sperm cells whit He-Ne laser prevents their *in vitro* storage dependent damage. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p.123-129, 2010.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 33–44, 2000.

KANEPS, A. J.; HULTEREN, B. D.; RIEBOLD, T. W.; SHIRES, G. M. H. Laser therapy in horse: histopathologic response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 3, p. 581-582, 1983.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power lase therapy. **IEEE Journal of Quantum Eletronics**, OE-23, v. 10, p. 1703-1717, 1987.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects od cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 313-326, 2000.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia**. 2. ed. Elsevier, 2008.

KNOBILL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 3. ed, Raven Press, 1994.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Response of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 5–6, p. 251–261, 2000.

LAVI R, ANKRI R, SINYAKOV M, EICHLER M, FRIEDMANN H, SHAINBERG A, BREITBART H, LUBART R. The Plasma Membrane is Involved in the Visible Light-Tissue Interaction. **Photomedicine Laser Surgery**, 2011. DOI: 10.1089/pho.2011.3083

LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2002.

LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51-60, 1995.

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

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

McLAY, D. W.; CLARKE, H. J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 1125, n. 5, p.625-633, 2003.

MÉNÉZO, Y. J. R. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p. 616-621, 2006.

MONTAG, M.; RINK, K.; DELACRÉTAZ, G.; VAN DER VEM, H. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p.846-852, 2000.

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

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

PASSARELA, S.; DECHECCHI, M. C.; QUAGLIARIELLO. Optical and biochemical properties of NADH irradiated by high peak power q-switched ruby laser or by low power C.W. HeNe laser. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 8, p. 315-326, 1981.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. S3-S40, 2010.

PINHEIRO, A. L. B.; MEIRELLES, G. C. S.; CARVALHO, C. M.; VIEIRA, A. L. B.; SANTOS, J. N.; RAMALHO, L. M. P. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar Rats. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 24, p. 616-624, 2006.

PONTES, J. H. F. NONATO-JUNIOR, I. SANCHES, B. V. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-7, 2009.

PORTER, M. Equine rehabilitation therapy for joint disease. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 21, p. 599-607, 2005.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 320-327, 2002

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

ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIM, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Journal of bioscience**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.

SAACKE, R.G. NADIR S.; NEBEL, R.L. Relationships of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 41, p. 45-50, 1994.

SAACKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal Dairy Science**, v. 66, p. 2635-2644, 1987.

SHAHAR. S.; WISER, A.; ICKOWICZ, D.; LUBART, R.; SHULMAN, A.; BREITBART, H. Light-mediated activation reveals a key role for protei kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility. **Human Reproduction**, doi: 10.1093/humrep/der232, 2011

SCREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Early embryonic mortality in the cowa: its relationship with progesterone concentration. **The Veterinary record**, v. 112, n. 22, p. 517-521, 1983.

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

SINGH, N. P.; MULLER, C. H.; BERGER, R. E. Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertility and sterility**, v. 80, n. 6, p. 1420-1430, 2003.

SLOWISKA, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. **Cryobiology**, v. 56, p. 100-102, 2008.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, A. V.; JU, J. C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 206-213, 2000.

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 227-238, 1996.

TESARIK, J. Paternal effects on cell division in human preimplantation embryo. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 370-375, 2005.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDONZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611-615, 2004.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALSHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stain ability in human sperm cells, a flow cytometry analysis with implication for male infertility. **Experimental Cell Research**, v. 241, p. 384-393, 1998.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIANA, J. H. M. SIQUEIRA, L. G. B. PALHÃO, M. P.; ALMEIDA CAMARGO, L. S. DE. Use of in vitro Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. s661-s674, 2010.

WATSON, P.F. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing Function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995

ANEXO A – Meio utilizado para o sêmen

- Talp Sêmen

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
NaCl	Sigma	S-5886	0,1M
KCl	Sigma	P-5405	0,003M
MgCl ₂	Sigma	M-2393	0,0004M
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	0,0003M
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	0,025M
CaCl ₂ H ₂ O	Sigma	C-5670	0,003 M
Ác. Lático syr.	Sigma	L-7900	0,3% (v/v)
Hepes	Sigma	H-0891	0,01M
pH = 7,4			OSM=295 – 300

ANEXO B – Soluções de sondas fluorescentes

- FITC-PSA**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
FITC-PSA	Sigma	L0770	100µg/ml
Ázida Sódica	Fisher	BP9221-500	10% (m/v)
DPBS (q.s.p)	-	-	20ml

- Iodeto de Propídeo**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
Iodeto de Propídeo	Sigma	P4170	0,5mg/ml
NaCl	Fisher	S5886	0,9% (v/v)

- JC-1**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
JC-1	Molecular Probes	T3168	76,5µM
DMSO	Sigma	D2650	-

ANEXO C - Soluções para teste SCSA

- **Tampão TNE**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl	Fluka	93363	0,01M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
EDTA	Sigma	E-5134	1mM
Água destilada (q.s.p)			500ml

Solução pH 7.4

- **Solução detergente ácida**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
HCl	Merck	K24537117	0,08M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
Triton x-100	Sigma	X-100	0,1% (v/v)
Água destilada			500ml

Solução pH 1.2

- **Solução de Laranja de Acridina (L.A) – estoque**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Laranja de Acridina	Sigma	A-6014	1mg/ml
Água destilada (q.s.p)			10ml

- **Solução de Laranja de Acridina - Uso**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Ácido cítrico	Sigma	0,12	0,1M
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S-5136	0,2M
EDTA	Sigma	E-5134	0,001M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
L.A estoque			6µg/ml
Água destilada (q.s.p)			120ml

Solução pH 6.0

ANEXO D- Meio de fatiamento e meios para maturação *in vitro* – MIV

- **Meio de fatiamento**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
Médium 199	Gibco	31100-035	-
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	2,2% (m/v)
Água milli-Q (q.s.p)	-	-	1L
pH=7,2			

Filtrar em 0,22 µm

- **Meio de lavagem MIV (Pré-MIV)**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
M-199 com HEPES	Gibco	12380-028	90% (v/v)
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	10% (v/v)
Pyruvato	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50µg/ml

Filtrar em 0,22 µm

- **Meio de maturação *in vitro***

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
M-199 com BICARBONATO	Gibco	11150-026	90%(v/v)
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	10%(v/v)
Piruvato	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina	Sigma	G-1264	50µg/ml
FSH	Bioniche	Folltropin-V	0,5µg/ml
hCG	Intervet	Chorulon	7UI/ml

Filtrar em 0,22 µm

Estradiol	Sigma	E-4389	1µg/ml
-----------	-------	--------	--------

ANEXO E - Soluções estoques e meio para FIV

- Soluções estoque para FIV (Parrish et al., 1988)**

Reagente	Fabricante	Catálogo	TALP STOCK	TALP SÊMEN
NaCl	Sigma	S-5886	0,01M	0,01M
KCl	Sigma	P-5405	0,003M	0,003M
MgCl ₂	Sigma	M-2393	0,5μM	0,4mM
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	0,35μM	0,3mM
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	0,025M	0,025M
CaCl ₂ H ₂ O	Sigma	C-5670	0,003M	0,003M
Ác.Lactico syr.	Sigma	L-7900	0,15% (v/v)	0,3% (v/v)
Hepes	Sigma	H-0891	*****	0,01M
pH = 7,4				OSM=295 – 300

Filtrar em 0,22μm

- Solução de Gentamicina**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
Sulfato de Gentamicina	Sigma	G-1264	50μg/ml
Solução fisiológica (q.s.p)	-	-	100ml

Aliquotar e manter a -20° C.

- Solução de Piruvato**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Ácido Pirúvico	Sigma	P-3662	0,02M
Água Destilada (q.s.p)	-	-	10ml

Aliquotar e manter a -20° C.

- Preparo da solução PHE**

Solução pH 4.0

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
Na Lactato	Sigma	L-7900	0,03M
Na metabisulfito	Sigma	S-1516	0,005M
Água Milli-Q (q.s.p)			50ml

pH = 4,0

Componentes da solução PHE

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Penicilamina 2 μ M	Sigma	P-40-3	0,3mg/ml salina 0,9%
Hipotaurina 1 μ M	Sigma	H-1384	0,109mg/ml salina 0,9%
Epinefrina 0,25 μ M	Sigma	21,930-4	0,04575mg/ml sol. pH 4,0

Solução PHE

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
Penicilamina	Sigma	P-40-3	2,5ml
Hipotaurina	Sigma	H-1384	2,5ml
Epinefrina	Sigma	21,930-4	2ml
Solução salina 0,9%			4ml

- Meio de lavagem FIV (Pré-FIV)**

Reagente	Fabricante	Catálogo	Volume
M-199 com HEPES	Gibco	12380-028	10 ml
BSA – V	Sigma	A-9647	0,003%(m/v)
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	0,2mM
Gentamicina 50 μ g/ml	Sigma	G-1264	50 μ g/ml

Filtrar em 0,22 μ m

- Meio FIV**

Reagente	Fabricante	Catálogo	10ml
TL – Stock			10 ml
BSA – Livre de Ácidos Graxos	Sigma	A-7511	0,006% (m/v)
Piruvato 0,2mM	Sigma	P-4562	20 μ l
Gentamicina 50 μ g/ml	Sigma	G-1264	50 μ l

Filtrar em 0,22 μ m

- Meio FIV gota**

Reagente	Fabricante	Catálogo	4ml
Meio – FIV			3.640 ml
Heparina 140usp/mg	Sigma	H-9399	40 μ l
PHE			160 μ l

Filtrar em 0,22 μ m

ANEXO F - Meio para cultivo (SOFaa)

- Solução SOFaa estoque**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Concentração
NaCl	Sigma	S-5886	0,1M
KCl	Sigma	P-5405	0,007M
KH ₂ PO ₄	Sigma	P-5655	0,0012M
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	0,025M
Na Lactato	Sigma	L-7900	0,003M
Ácido Pirúvico	Sigma	P-3662	0,0062mM
L-glutamina	Sigma	G-8540	0,001M
MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma	M-2393	0,0005M
CaCl ₂	Sigma	C-5670	0,002M

Filtrar em 0,22 µm

- Meio SOFaa (Uso)**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	5ml
Meio SOF estoque			4,6ml
Aminoácidos essenciais	Sigma	M-5550	0,100ml
Aminoácidos não essenciais	Sigma	M-7145	0,050ml
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	0,250ml

Preparar na hora do uso

ANEXO G - Soluções para ensaio de TUNEL

- **Solução de PBS 0.2M**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
K ₂ HPO ₄ 0.2M	Sigma	P-5655	0.2M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
Água Milli Q (q.s.p)			1L

pH 7.4

- **Solução de PBS 10mM**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
K ₂ HPO ₄ 10mM	Sigma	P-5655	10mM
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
Água Milli Q (q.s.p)			1L

pH 7.4

- **Solução de PBS-PVP**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
PBS 10mM			10mM
Polivinilpirrolidona (PVP)	Sigma	P-0930	1%(m/v)

- **Solução de Hidróxido de Sódio 2N**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
NaOH	Synth	H 1017.01.AH	2N
Água Milli Q (q.s.p)			1L

- **Solução de Paraformaldeído 8% (estoque)**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
Paraformaldeído	EMS	19210	8% (m/v)
Água Milli Q (55-60oC) (q.s.p)			1L

* adicionar algumas gotas de NaOH 2N até a solução ficar incolor. Filtrar (0,22µm) e estocar a -20oC

- **Solução de Paraformaldeído 4% (uso)**

* fazer uma solução 1:1 de paraformaldeído 8% e PBS 0.2M no momento do uso.

- **Solução de Permeabilização**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	200ml
Triton X-100 0,5%	Sigma	X-100	0,5% (v/v)
Solução de Citrato de Sódio 0,1%			0,1% (v/v)

- **Solução de citrato de sódio 0,1%**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Citrato de Sódio	Sigma	S-4641	0,01%(m/v)
Água MilliQ (q.s.p)			200ml

- **Solução de DNase**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
DNase I	Invitrogen	18047-019	50U/ml
PBS-PVP (q.s.p)			100ml

* preparar a solução apenas no momento do uso

- **Solução de Hoechst 33342 (5µg/ml) - Estoque**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Hoechst 33342	Sigma	B-2261	5 µg/ml
PBS (q.s.p)	Nutricell	01.002.1000	1ml

Estocar a -20°C

- **Solução de Hoechst 33342 - Uso**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1ml
Solução de Hoechst 33342 estoque			1µl
PBS-PVP			1ml

* Preparar apenas no momento do uso

- **Solução de DABCO**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	10ml
1,4-Diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO)	Sigma	D-2522	0,23g
Tris 0.5M, pH 8.0	Fluka	93363	0,4ml
Glicerol	Sigma	G-5516	5ml
Água destilada			4,6ml

Manter a 4°C, abrigado da luz.

ANEXO H - Soluções para ensaio COMETA

- Solução de TBE 1X**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Trizma Base	Fluka	93362	0,089M
Ácido Bórico	Carlo Erba	402766	0,089M
EDTA	Sigma	E-5134	0,002M
Água destilada q.s.p			1L

- Agarose *Normal Melting* (NM)**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Agarose <i>Normal Melting</i>	Sigma	A-9539	1% (m/v)
TBE 1X (q.s.p)			100ml

Manter a 4°C

- Agarose *Low Melting* (LM)**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	100ml
Agarose <i>Low Melting</i>	Sigma	A-4018	0,75% (m/v)
TBE 1X			100ml

- EDTA-Na2**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA	Sigma	E-5134	1M
Água MilliQ (q.s.p)			1L

pH 7.8

- Tris-HCl**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl	Fluka	93363	1M
Água MilliQ (q.s.p)			100ml

pH 7.8

- **NaCl**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
NaCl	Sigma	S-5886	5M
Água MilliQ			1L

- **DTT**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen	15508-013	1M
Água MilliQ (q.s.p)			4ml

Aliquotar e manter a -20°C

- **Solução de ressuspensão da proteinase K**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl; pH 7.5	Fluka	93363	10mM
CaCl ₂	Sigma	C-5670	20mM
Glicerol	Sigma	G-5516	50% (v/v)
Água MilliQ q.s.p			10ml

pH 7.5

- **Solução de Proteinase K**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Proteinase K	Invitrogen	25530-015	2mg/ml
Solução de ressuspensão (q.s.p)			2ml

Aliquotar e manter a -20°C

- **Solução de Cloreto de cálcio hidratado**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
CaCl ₂	Sigma	C-5670	0,2M
Água MilliQ			10ml

- **Poli-L-Lisina 0,01 %**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Poly-L-Lysine	Sigma	P-8920	0,01%
Água destilada (q.s.p)			200ml

Manter a -4°C

- **Solução de Lise I**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA-Na2			100mM
Tris HCl	Fluka	93363	10mM
NaCl	Sigma	S-5886	2,5M
Proteinase K (20µg/mL)	Invitrogen	25530-015	20µg/mL
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Manter a -4°C

- **Solução de Lise II**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA-Na2			100mM
Tris HCl	Fluka	93363	10mM
NaCl	Sigma	S-5886	2,5M
Triton X-100	Sigma	X-100	4% (v/v)
DTT; pH 11.0	Invitrogen	15508-013	40mM
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Manter a -40C

- **Solução alcalina de eletroforese**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
NaOH	Synth	H1017.01.AH	300mM
.EDTA-Na2			1mM
Água MilliQ (q.s.p)			1L

pH>13.0

- **SYBR Green I**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
SYBR Green I	Sigma	S9430	5000x
Água destilada (q.s.p)			1ml

* solução para coloração de cada lâmina