

EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS SOBRE A FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* NOS BOVINOS

EFFECT OF PROSTAGLANDINS ON *IN VITRO* FERTILISATION OF BOVINE OOCYTES

C.C. Marques, M.C. Baptista, R.M. Pereira, M.I. Vasques, A.E.M. Horta
Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional -INIA,
2000-763 Vale de Santarém

RESUMO

As prostaglandinas (PG) parecem estar envolvidas nas várias fases de maturação dos oócitos e spz, influenciando assim o posterior processo de fertilização e desenvolvimento embrionário. Pretendeu-se determinar o efeito da suplementação do meio de fertilização, (FERT) com um inibidor de síntese das prostaglandinas (indometazina - Indo) e $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 e PGE_1 , sobre a clivagem, qualidade, viabilidade e desenvolvimento embrionário. Na exp.1 (10 sessões, 1204 oócitos) o meio FERT (TALP + Heparina + PHE) foi suplementado com $PGF_{2\alpha}$, constituindo-se os seguintes grupos: Testemunha; Indo ($2,8 \times 10^{-5}$ M), $PGF_{2\alpha}$ ($1,4 \times 10^{-7}$ M) e Indo+ $PGF_{2\alpha}$ ($2,8 \times 10^{-5}$ M + $1,4 \times 10^{-7}$ M). Na exp.2 (10 sessões, 1247 oócitos) e exp.3 (9 sessões, 1281 oócitos) realizaram-se os mesmos tratamentos, substituindo-se a $PGF_{2\alpha}$ por PGE_2 (exp.2) e PGE_1 (exp.3). Na fertilização utilizou-se sémen descongelado, processado pelo método do swim-up (TALP s/Ca com cafeína) durante 1 hora, sendo utilizada uma concentração final de 1×10^6 spz/mL. Após 22 horas de incubação os oócitos inseminados foram transferidos para um sistema de co-cultura com células da granulosa (TCM 199 + 10% soro de vaca superovulada) e às 48 horas avaliou-se a clivagem, tendo-se acompanhado o desenvolvimento embrionário até à fase de extrusão. A qualidade dos embriões foi avaliada ao 8º dia de desenvolvimento utilizando uma escala que variou de grau 1 (muito bom) a grau 4 (mau). Em todas as experiências, a inibição da síntese das PG (Indo) reduziu significativamente a taxa de fertilização relativamente ao grupo testemunha (menos 14,8%; 8,3% e 7,6%, respectivamente nas experiências 1-3; $P < 0,05$). A $PGF_{2\alpha}$, isoladamente ou em associação com a Indo, não foi capaz de inverter o efeito negativo da Indo sobre a taxa de fertilização, relativamente ao grupo testemunha (58,3% e 56,4% vs. 67,8% respectivamente; $P < 0,05$). A PGE_2 , na ausência ou presença de outras PG (Indo+ PGE_2 e PGE_2), conseguiu inverter o efeito negativo da indometazina sobre a clivagem observada no grupo testemunha (56,0% e 52,2% vs. 59,1%, respectivamente; $P > 0,05$). A PGE_1 só conseguiu esta inversão do efeito negativo da indometazina, na ausência de outras PG (PGE_1 +Indo: 51,6% vs. 55,3%; $P > 0,05$). Quando na presença de outras PG, a PGE_1 não conseguiu aproximar a taxa de clivagem à do grupo testemunha (PGE_1 : 47,2% vs. 55,3%; $P < 0,04$), sugerindo que a sua acção sobre este mecanismo depende de outras PGs. Relativamente ao desenvolvimento embrionário verificou-se que as diferenças significativas entre os tratamentos para os diferentes estadios de desenvolvimento nos dias 7 e 8 anulam-se relativamente ao atraso ou avanço do crescimento embrionário dos diferentes grupos para os dias 9 e 10. A inibição da síntese das PG no meio FERT prejudicou a qualidade dos embriões ao 8º dia de desenvolvimento, salientando-se a acção da PGE_2 que melhorou significativamente a qualidade dos embriões relativamente ao grupo testemunha. Estes resultados evidenciam um papel determinante de algumas prostaglandinas sobre a fertilização e qualidade dos embriões, identificando-se a PGE_2 e a PGE_1 com um papel positivo, embora esta última na dependência de outras PG.

SUMMARY

Prostaglandins (PG) have been reported to be involved in different stages of oocyte and sperm maturation, affecting subsequent fertilisation and embryo development. The purpose of this study was to determine the effect of a PG synthesis inhibitor (indomethacin, Indo) and of $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 and PGE_1 added to the fertilisation medium (FERT), on cleavage and embryo development rates and on embryo quality at Day 8 (D8) of culture. In experiment 1 (Exp. 1, 10 trials, 1204 oocytes), $PGF_{2\alpha}$ was added to FERT (TALP+heparin+PHE) according to the

following treatments: Control (C); indomethacin (Indo, $2,8 \times 10^{-5}$ M); $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1,4 \times 10^{-7}$ M) and Indo ($2,8 \times 10^{-5}$ M) + $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1,4 \times 10^{-7}$ M). In experiment 2 (Exp. 2, 10 trials, 1247 oocytes) and in exp. 3 (Exp. 3, 9 trials, 1281 oocytes) $\text{PGF}_{2\alpha}$ was replaced by PGE_2 (Exp.2) and by PGE_1 (Exp.3), following the same treatments as described above. Bovine thawed semen was processed by swim-up for 1 hour in calcium-free TALP medium with caffeine. A final sperm concentration of 1×10^6 sperm/mL was used for insemination. After 22 hours of incubation, embryos were transferred to a granulosa cell co-culture system (1×10^6 cells/mL of TCM199 + 10% oestrus superovulated cow serum). Embryos were evaluated for cleavage by 48 hours after insemination and throughout development from D8 until the hatched blastocyst stage. Embryo quality was also assessed at D8 and embryos were classified from grade1 (very good) to grade 4 (poor).

Results show that prostaglandin inhibition significantly reduced fertilisation rates in all experiments (14,8%, 8,3% and 7,6% less in Indo groups, from experiments 1 to 3, respectively, than in control group, $P < 0,05$). $\text{PGF}_{2\alpha}$ was unable to reverse the negative effect of indomethacin on fertilisation rates (58,3% and 56,4%, in $\text{PGF}_{2\alpha}$ and Indo+ $\text{PGF}_{2\alpha}$ groups, respectively, vs 67,8% in control group; $P < 0,05$). PGE_2 could reverse that effect, either in the presence of other prostaglandins or alone (52,2% and 56,0% in PGE_2 and Indo+ PGE_2 groups, respectively, vs. 59,1% in control; $P > 0,05$). PGE_1 could only reverse that negative effect in Indo+ PGE_1 group (51,6% vs 55,3% in control; $P > 0,05$). When other prostaglandins were present, PGE_1 could not reach the control group fertilisation rates ($\text{PGE}_1 = 47,2\%$ vs Control = 55,3%; $P < 0,04$), suggesting that its effect on fertilisation depends on the presence of other PGs. Significant differences among treatments on different stages of embryo development by D7 and D8 disappeared through a delay or a progress in embryo development by D9 and D10 for the same treatments. PG synthesis inhibitor added to the fertilisation medium had a detrimental effect on D8 embryo quality, while PGE_2 significantly improved quality when compared to the control group. These results indicate that some PG have an essential role on embryo fertilisation and quality, such as PGE_2 and PGE_1 , which showed a positive effect on these mechanisms, although PGE_1 effect depends on the presence of other PG.

INTRODUÇÃO

As prostaglandinas (PG) são hormonas presentes na totalidade dos tecidos do tracto reprodutivo dos animais domésticos, pelo que os processos fundamentais da reprodução, como a maturação dos gâmetas masculino e feminino, a fertilização e o próprio desenvolvimento embrionário, parecem depender da sua actuação. De facto, a PGE_2 parece exercer um efeito estimulante da maturação do oócito bovino *in vitro*, quer antagonizando a acção de outros prostanóides prejudiciais, quer estimulando directamente a meiose (Marques e col., 1997). Também nos bovinos, o enzima necessário à síntese destas hormonas, a ciclooxigenase, está presente na região apical da cabeça dos espermatozóides, na região pós-acrosomal e cauda, sugerindo que as PG têm diferentes funções de acordo com a localização anatómica da sua síntese. Enquanto a presença a nível da cabeça poderá estar relacionada com a reacção acrosómica, a nível da cauda ela poderá ser fundamental para o processo metabólico de produção de energia necessária à motilidade dos espermatozóides (Shalev e col., 1994). A capacidade de fertilização implica por parte dos espermatozóides a aquisição de movimentos de hiperactivação e posteriormente a reacção acrosómica, fenómenos que se verificam apenas após a sua incubação durante algumas horas no tracto genital feminino ou após condições específicas de cultura *in vitro* (Harrison, 1996).

O trabalhos de Baptista e col. (2000), utilizando a tecnologia de produção *in vitro* de embriões bovinos, tiveram como objectivo determinar o efeito da suplementação de algumas prostaglandinas, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a PGE_1 , e da sua inibição pela indometazina, sobre a clivagem, sendo essa suplementação efectuada numa fase inicial de maturação dos espermatozóides, a fase de capacitação (Baptista e col., 2000). Nenhum estudo tinha referido até aqui o efeito das prostaglandinas sobre a clivagem e posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*, adicionando-se as hormonas quer ao meio de capacitação, quer ao meio de fertilização. Com o presente trabalho pretende determinar-se o efeito de um inibidor da síntese das prostaglandinas, a

indometazina, e da $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 e PGE_1 , sobre a clivagem e sobre a qualidade, viabilidade e desenvolvimento embrionário bovinos *in vitro*. sendo essa suplementação feita no meio de fertilização, correspondendo a uma fase mais tardia da maturação dos gametas masculinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e maturação de oócitos *in vitro*: Os ovários são recolhidos no matadouro regional de Santarém, sendo transportados até ao laboratório em solução tamponada fosfatada (PBS) enriquecida com antibiótico e albumina sérica bovina (BSA), a 37°C. Os folículos ovários de 2 a 8 mm de diâmetro são aspirados com agulhas de 19-g e seringas de 10ml, em ambiente esterilizado no interior de câmara de fluxo laminar. Do líquido folicular assim obtido seleccionam-se os oócitos envolvidos por uma ou várias camadas compactas de células do *cumulus* (COC) não expandidas, e com citoplasma uniformemente regular. Os oócitos seleccionados seguem para a maturação em meio próprio (TCM 199, enriquecido com 5% de soro de vaca em cio superovulada, 100UI ml^{-1} de penicilina, 100 μg ml^{-1} de estreptomicina e 3 a 5 $\times 10^6$ células da granulosa em suspensão por ml de meio), durante um período de 24 horas em estufa incubadora a 39°C com 5 % de CO_2 e máxima humidade (Marques e col., 1997).

Capacitação dos espermatozoides *in vitro*: O sêmen, previamente descongelado a 37°C e colocado no fundo de tubos de vidro contendo meio Tyrode modificado (TALP), sem cálcio e suplementado com 48,55 g ml^{-1} de cafeína, é posto a maturar durante uma hora em estufa incubadora a 39°C com 5% de CO_2 e máxima humidade. Durante este período, os espermatozoides mais activos progridem até à superfície do líquido de capacitação (*swim-up*), sendo depois o líquido sobrenadante que os contém recolhido, centrifugado a 500g durante 10 minutos e o resíduo concentrado. A concentração é em seguida determinada em câmara hematimétrica de Neubauer (Baptista e col., 2000).

Fertilização *in vitro*: A fertilização é feita em microgotas de 40 μl de meio específico (FERT: meio TALP modificado com cálcio, suplementado com 30 μg ml^{-1} de heparina e 4%, v/v, de penicilamina, hipotaurina e epinefrina, 100UI ml^{-1} de penicilina e 100 μg ml^{-1} de estreptomicina), submersas em óleo mineral, em estufa incubadora e nas condições físicas já referidas anteriormente, durante 22 horas. Em cada microgota são colocados 10 oócitos já maturados, com apenas uma a duas camadas de células do *cumulus*, e os espermatozoides preparados como referimos anteriormente, na concentração de 1×10^6 spz ml^{-1} . Depois do período de fertilização, os oócitos inseminados são transferidos para placas de cultura celular, contendo gotas com monocamadas de células da granulosa, já com um período de cultura de 48 horas (Pereira e col., 1997). Cerca de 48 horas após a inseminação podem observar-se já os oócitos que clivaram, encontrando-se estes no estadio de duas ou mais células.

De acordo com os tratamentos instituídos no meio de fertilização (FERT), delinearão-se as seguintes experiências:

Experiência 1 (10 sessões com um total de 1204 oócitos inseminados), em que foi testada a $\text{PGF}_{2\alpha}$, constituindo-se os seguintes grupos: Grupo Testemunha (n=323), sem suplementação, grupo $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n=290), com meio de fertilização suplementado com $\text{PGF}_{2\alpha}$, na dose de $1,4 \times 10^{-7}\text{M}$ (Gurevich e col., 1993), grupo Indometazina (Indo, n=302), sendo o meio suplementado com indometazina na dose de $2,8 \times 10^{-5}\text{M}$ (Okuda e col., 1995) e grupo Indo+ $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n=289), em que ambos os produtos foram adicionados ao meio FERT nas doses já referidas para cada um deles.

Experiência 2 (10 sessões, com um total de 1247 oócitos inseminados), que testou a PGE_2 , constituindo-se grupos semelhantes: Testemunha (n=318), grupo PGE_2 (n=316), em que esta PG foi suplementada na dose de $1,4 \times 10^{-7}\text{M}$, grupo Indometazina (n=311), na dose de $2,8 \times 10^{-5}\text{M}$ e grupo Indo+ PGE_2 (n=302, 10 sessões), adicionando-se simultaneamente os dois produtos em doses idênticas.

Experiência 3 (9 sessões, num total de 1281 oócitos inseminados), que utilizou a PGE_1 no meio de fertilização, de acordo com os seguintes grupos: Testemunha (n=318), grupo PGE_1 (n=322), em que esta PG foi suplementada na dose de $1,4 \times 10^{-7}\text{M}$, grupo Indometazina (n=321), na dose de $2,8 \times 10^{-5}\text{M}$ e grupo Indo+ PGE_1 (n=320).

Desenvolvimento embrionário *in vitro*: A observação do desenvolvimento embrionário inicia-se ao 6º dia pós-inseminação (pi,) continuando até à fase da sua eclosão da zona pelúcida, que se verifica nos bovinos entre o 9º e o 11º dias pi, passando pelos estadios de mórula compacta (6º dia), jovem blastócito (7º dia), blastócito (8º dia) e blastócito expandido (entre o 8º e 11º dias pi). Durante as várias fases do seu desenvolvimento, os embriões são classificados segundo uma escala de qualidade que varia entre o grau 1 (Gr 1), abarcando os embriões excelentes sem sinais de degenerescência, em que o estadio de desenvolvimento corresponde à sua idade, e o grau 4 (Gr 4), que engloba os embriões degenerados ou com atrasos elevados no seu desenvolvimento.

O efeito dos tratamentos instituídos durante a fase de fertilização foi determinado pela taxa de clivagem (oócitos clivados/oócitos inseminados x 100), pelo número de embriões produzidos entre os 7 e os 10 dias (embriões produzidos/oócitos clivados x 100) e pela taxa de embriões extrusados (embriões extrusados/blastócitos x 100), utilizando o teste do qui-quadrado entre os vários grupos nas três experiências descritas.

RESULTADOS

Nas três experiências efectuadas verifica-se que a indometazina adicionada ao meio de fertilização provoca uma diminuição significativa das taxas de fertilização dos oócitos, relativamente ao grupo Testemunha (menos 14,8%, 8,3% e 7,6%, respectivamente nas experiências 1 a 3).

A PGF_{2α} (experiência 1), isoladamente ou em associação com a Indo, não consegue inverter o efeito negativo da indometazina relativamente ao grupo Testemunha, apresentando valores significativamente mais baixos. (58,3% e 56,4% vs. 67,8%, respectivamente, Tabela 1).

Tabela 1. Efeito das várias PG adicionadas ao meio FERT sobre as taxas de fertilização (%) de oócitos maturados *in vitro* (Experiências 1 e 2, 10 réplicas e Experiência 3, 9 réplicas. n = oócitos inseminados).

Grupos	Experiência 1 (PGF _{2α})		Experiência 2 (PGE ₂)		Experiência 3 (PGE ₁)	
	n	%	n	%	n	%
I – Testemunha	323	67,8 ^a	318	59,1 ^a	318	55,3 ^a
II – Indo	302	53,0 ^b	311	50,8 ^b	321	47,7 ^b
III -Indo+PG	289	56,4 ^b	302	56,0 ^{ab}	320	51,6 ^{ab}
IV - PG	290	58,3 ^b	316	52,2 ^{ab}	322	47,2 ^b
<i>Valor de P (χ²)</i>	I-II: 0,0001 I-III: 0,004 I-IV: 0,015		I-II: 0,036		I-II: 0,052 I-IV: 0,039	

Na experiência 2 (Tabela1), verificou-se que o grupo da Indo provocou uma diminuição significativa da taxa de fertilização relativamente ao grupo Testemunha (50,8% vs 59,1%). A PGE₂, quer associada à Indo quer isoladamente, conseguiu elevar este índice para valores não significativamente diferentes do grupo Testemunha. Na experiência 3 (Tabela 1), o grupo Testemunha apresentou uma taxa de fertilização significativamente superior à dos grupos Indo e PGE₁ (53,3% vs. 47,2% e 47,2%, respectivamente). A PGE₁ associada à Indo, conseguiu elevar a taxa de fertilização para um valor não significativo relativamente ao grupo Testemunha.

Quanto ao efeito dos tratamentos instituídos no meio FERT sobre a produção de embriões ao dia 7 (D7), dia 8 (D8) e extrusados, verifica-se que nas 3 experiências efectuadas não foram encontradas diferenças significativas em relação à produção de embriões em D7 e embriões extrusados (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito das PG adicionadas ao meio FERT sobre a produção de embriões (%) em diferentes dias de cultura (10 réplicas; n = embriões clivados).

Grupos	Experiência 1 (PGF _{2α})			Experiência 2 (PGE ₂)			Experiência 3 (PGE ₁)					
	n	D7 (%)	D8 (%)	EXT (%)	n	D7* (%)	D8 (%)	EXT (%)	n	D7** (%)	D8 (%)	EXT (%)
I - Testemunha	219	20,5	19,6 ^{ab}	60,5	172	26,7	29,3	65,5	160	21,3	25,0	74,7
II - Indo	160	20,0	18,8 ^{ab}	56,7	143	26,6	26,6	76,2	138	24,6	24,8	73,7
III - Indo+ PG	163	19,6	16,6 ^a	51,9	155	26,5	30,8	67,3	148	21,6	25,5	78,6
IV - PG	169	26,0	24,9 ^b	66,7	147	26,5	29,7	63,3	134	23,9	26,3	65,0
Valor de P(χ^2)		P>0,05	III-IV: 0,06	P>0,05		P>0,05	P>0,05	P>0,05		P>0,05	P>0,05	P>0,05

* 9 réplicas ; ** 8 réplicas

Em D8, na experiência 1 (Tabela 2), o grupo Indo+PGF_{2α} apresentou uma produção de embriões significativamente mais baixa (16,6%) do que a observada no grupo PGF_{2α} (24,9%), sendo este tratamento o que apresentou valores absolutos mais elevados (embora não significativos) nas outras duas fases de crescimento consideradas. Nas experiências 2 e 3 (Tabela 2) não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, em nenhuma das fases de crescimento estudadas.

Tabela 3. Influência dos tratamentos com PG no meio FERT, sobre a qualidade dos embriões ao 8º dia de cultura (grau 1 = muito bom grau 4 = mau; 10 réplicas).

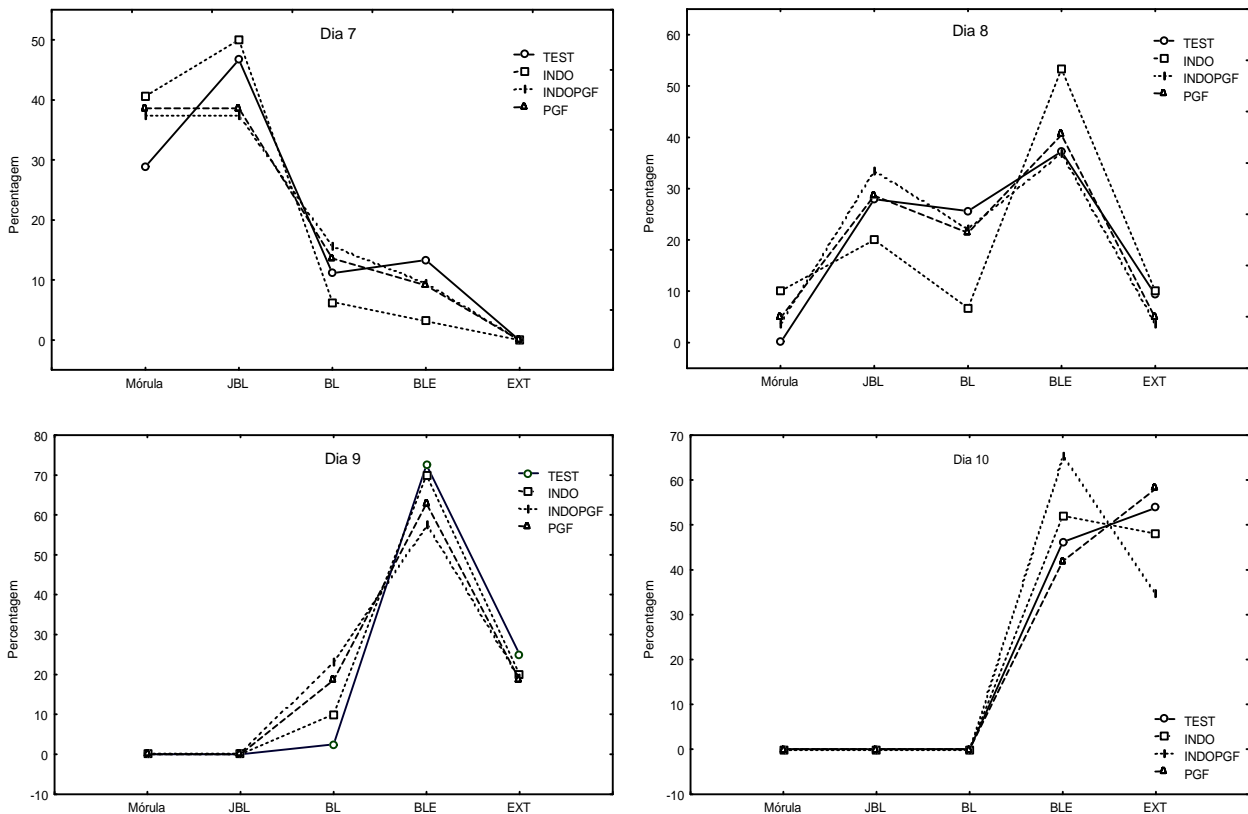
	Grupos	Embriões em D8 (n)	Distribuição da qualidade (%)			
			Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Experiência 1 (PGF)	I - Testemunha	43	2,3	20,9 ^a	30,2 ^a	46,5
	II - Indo	30	3,3	3,3 ^b	60,0 ^b	33,3
	III - Indo+PGF _{2α}	27	3,7	25,9 ^a	33,3 ^a	37,0
	IV - PGF _{2α}	42	2,4	11,9 ^{ab}	47,6 ^{ab}	38,1
	Valor de P (χ^2)		P>0,05	I-II: 0,026 II-III: 0,014	I-II: 0,011 II-III: 0,044	P>0,05
Experiência 1 (PGE ₂)	I - Testemunha	55	3,6	27,3 ^{ac}	41,8	27,3 ^a
	II - Indo	42	0	19,0 ^a	31,0	50,0 ^b
	III - Indo+PGE ₂	52	5,8	44,2 ^b	30,8	19,2 ^a
	IV - PGE ₂	49	0	34,7 ^{bc}	40,1	24,5 ^a
	Valor de P (χ^2)		P>0,05	I-III: 0,067 II-III: 0,01 II-IV: 0,032	P>0,05	I-II: 0,022 II-III: 0,002 II-IV: 0,044
Experiência 1 (PGE ₁)	I - Testemunha	44	0	29,5	40,9	29,5 ^a
	II - Indo	38	0	21,1	31,6	47,4 ^{bc}
	III - Indo+PGE ₁	42	2,4	35,7	38,1	23,8 ^a
	IV - PGE ₁	40	0	27,5	37,5	35,0 ^{ac}
	Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P>0,05	I-II: 0,097 II-III: 0,027

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados dos tratamentos a incorporação de PGs no meio de fertilização, sobre a qualidade de embriões em D8. Na experiência 1, não houve diferenças significativas entre tratamentos relativamente aos embriões de grau 1 (Gr1). Em grau 2 (Gr2) houve significativamente menos embriões no grupo da Indometazina (3,3%) do que nos grupos Testemunha (20,9%) e Indo+PGF_{2α} (25,9%). Em grau 3 (Gr3), a Indometazina apresenta

uma percentagem de embriões significativamente superior à dos grupos Testemunha e Indo+PGF_{2α} (60,0% vs. 30,2% e 33,3%, respectivamente). Em grau 4 (Gr4), não foram encontradas diferenças entre os vários tratamentos. Quanto à qualidade dos embriões em D8 na experiência 2, em que a PGE₂ é incorporada no meio de fertilização, verificou-se ainda que ela não apresentou diferenças na classe de embriões de Gr1. Em embriões de Gr2, o grupo Indo apresentou uma taxa de embriões significativamente mais baixa (19,0%) que os grupos Indo+PGE₂ (44,2%) e PGE₂ (34,7%). O grupo Indo+PGE₂ apresentou uma taxa de embriões de Gr2 significativamente mais elevada (44,2%) que os grupos Testemunha (27,3%) e Indo (19,0%). Em embriões de Gr3, não houve diferenças entre os tratamentos. Em embriões de Gr4 (a classe de pior qualidade), o grupo Indo apresentou uma percentagem significativamente superior à dos restantes grupos, dobrando as incidências neles observadas. Na experiência 3, o grupo Indo (47,4%) lidera de forma significativa a classe de embriões de pior qualidade (Gr4) relativamente aos grupos Testemunha (29,5%) e Indo+PGE₁ (23,8%).

Quanto à velocidade de crescimento dos embriões entre os dias 7 e 10 de desenvolvimento, verifica-se que, na experiência 1 (Gráfico 1), relacionada com a incorporação de PGF_{2α} ao meio FERT, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos apenas em D7. Em D8 verificou-se uma taxa significativamente mais elevada de mórulas (M) no grupo Indo (10,0%), relativamente ao grupo Testemunha (0,0%) e uma taxa significativamente inferior de embriões em estadio de blastócito (BL) no grupo Indo (6,7%) em relação ao grupo Testemunha (25,6%).

Gráfico 1. Estadio de desenvolvimento embrionário (Experiência 1 - PGF_{2α}).

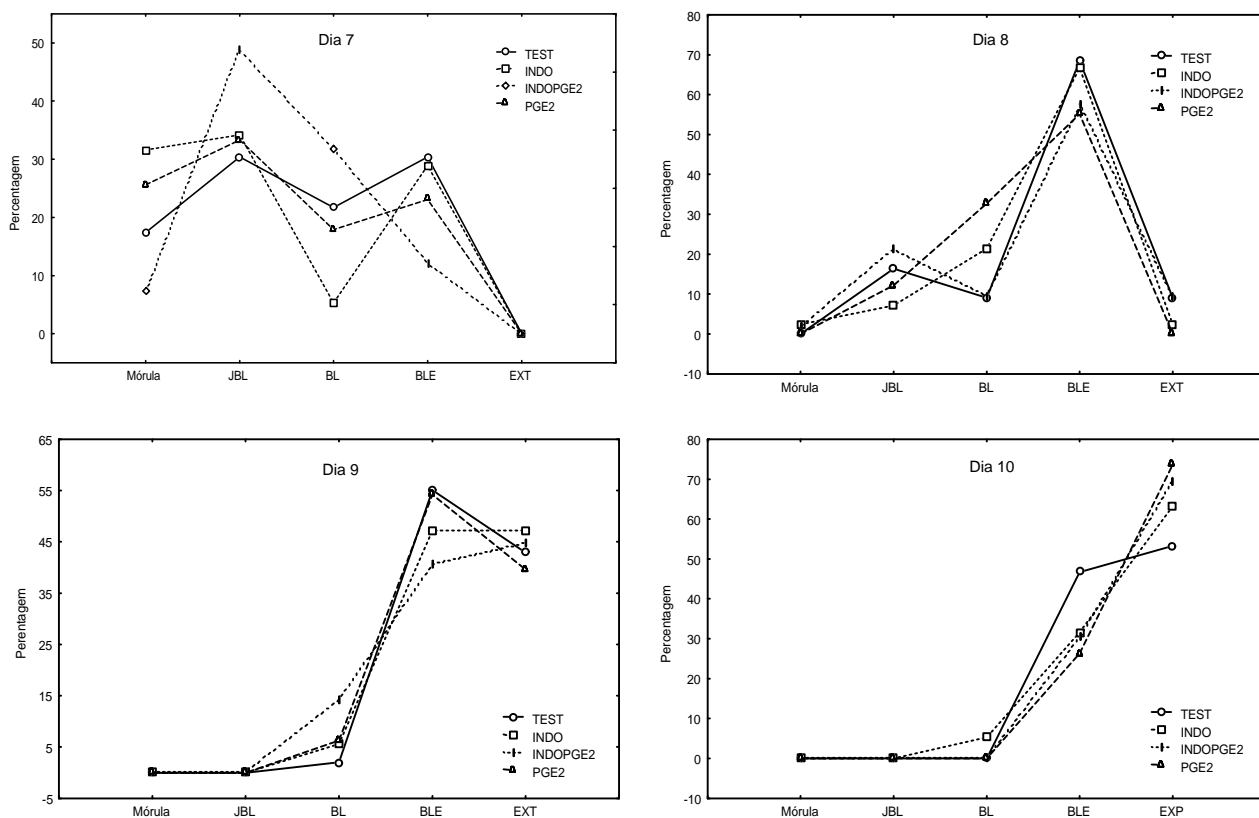


Relativamente aos grupos Indo+PGF_{2α} (22,2%) e PGF_{2α} (21,4%), verificou-se uma tendência (P<0,10) destes dois grupos para valores significativamente mais elevados de embriões em BL relativamente ao grupo Indo (6,7%). Em D9, verificou-se um aumento significativo da percentagem de embriões em BL nos grupos Indo+PGF_{2α} (23,1%) e PGF_{2α} (18,6%) em relação ao grupo Testemunha (2,5%). Em D10, há uma tendência (P<0,10) para uma percentagem mais elevada de embriões em estadio de blastócito expandido (BLE) no grupo

tratado com Indo+PGF_{2α} (65,2%) relativamente ao grupo PGF_{2α} (41,9%; P<0,10). Em estadio de extrusados (EXT), no tratamento com Indo+PGF_{2α} há também tendência (P<0,10) para uma percentagem de embriões mais baixa (34,8%) do que a observada no grupo PGF_{2α} (58,1%).

Na experiência 2 (Gráfico 2), ao dia 7 de cultura, o grupo Indo+PGE₂ apresentou significativamente menos mórulas (7,3%) que os grupos Indo (31,6%) e PGE₂ (25,6%). Em estadio de BL, é o grupo da Indo que apresenta valores significativamente inferiores (5,3%) relativamente aos grupos Testemunha (21,7%), grupo Indo+PGE₂ (31,7%) e grupo PGE₂ (17,9%). Em estadio de BLE e no mesmo dia, verificou-se que o grupo Indo+PGE₂ foi significativamente inferior (12,2%), quer ao grupo Testemunha (30,4%) quer ao grupo Indo (28,9%). Já em D8, o grupo Indo apresentou significativamente menos embriões em estadio de JBL (7,1%) do que o grupo Indo+PGE₂ (21,2%). O grupo Testemunha apresentou uma taxa de embriões em BL significativamente inferior (9,1%) à dos grupos Indo (21,4%) e PGE₂ (32,7%). Ainda em D8 e no estadio de BLE, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. No estadio EXT, o grupo Testemunha foi significativamente superior (9,1%) em relação ao grupo PGE₂ (0%), tendo o grupo Indo+PGE₂ apresentado valores significativamente mais elevados (9,6%) do que o grupo PGE₂ (0%) neste estadio. Em D9, apenas se verificaram diferenças significativas no estadio de BL entre os grupos Testemunha e Indo+PGE₂ (2,0% vs. 14,3%, respectivamente) a favor deste último tratamento. Em D10, não foram encontradas diferenças significativas entre os quatro grupos estudados.

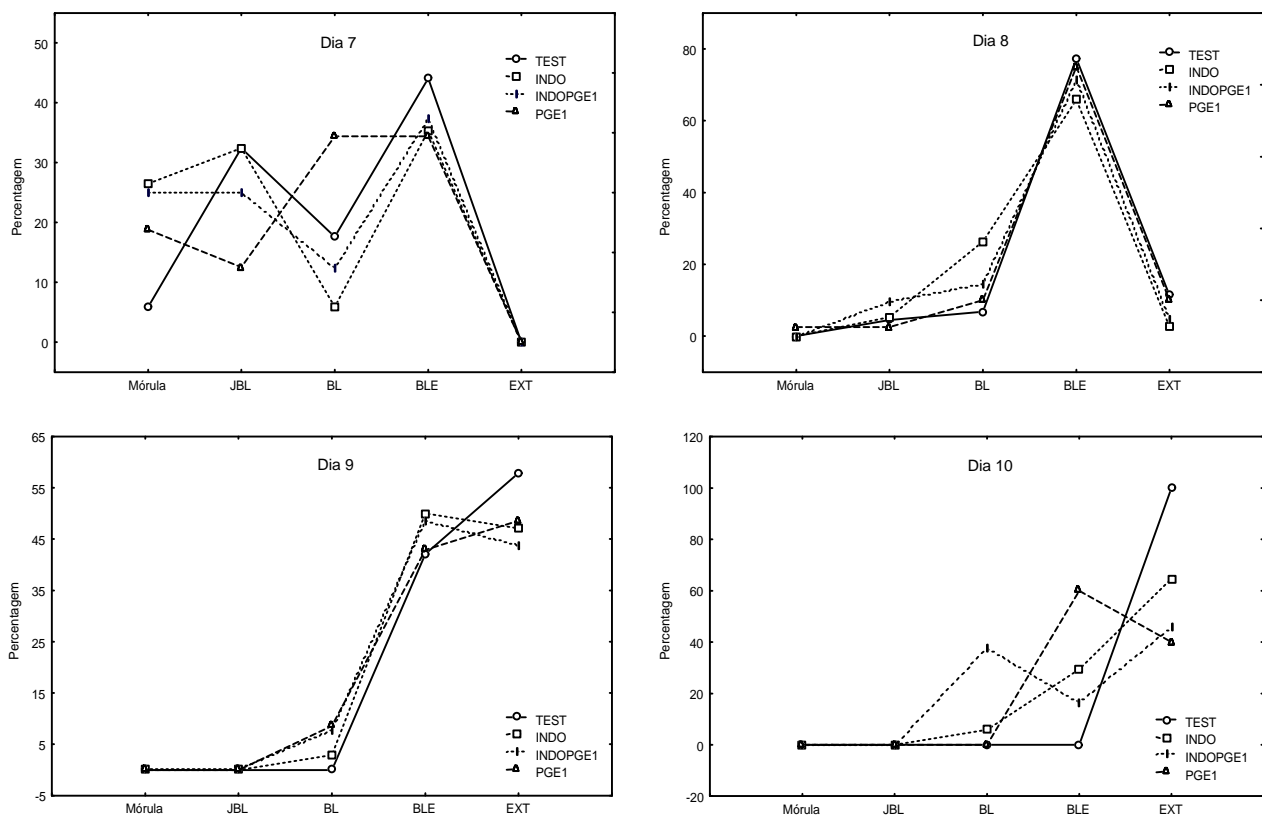
Gráfico 2. Estadio de desenvolvimento embrionário (Experiência 2 - PGE2).



Na experiência 3 (Gráfico 3), verificou-se que em D7, o grupo Testemunha apresentou no estadio de M, uma taxa de embriões significativamente inferior (5,9%) relativamente aos grupos Indo (26,5%) e Indo+PGE₁ (25,0%). Em estadio de JBL, o grupo Testemunha demonstrou uma taxa de embriões significativamente superior (32,4%) em relação ao grupo PGE₁ (12,5%). Em BL, o grupo PGE₁ é significativamente superior (34,4%) aos grupos Indo (5,9%) e Indo+PGE₁ (12,5%), enquanto em BLE não houve diferenças entre os grupos. Em D8, apenas se verificaram diferenças significativas no estadio de BL, relativamente ao grupo Indo, que apresentou uma

taxa de embriões significativamente superior (26,3%), quer em relação ao grupo Testemunha (6,8%), quer em relação ao tratamento com PGE₁ (10,0%). Em D9 houve apenas diferenças entre os tratamentos nos embriões em estadio de BL, tendo o grupo Testemunha apresentado uma taxa de embriões significativamente inferior (0,0%) relativamente às dos grupos Indo+PGE₁ (7,7%) e PGE₁ (8,6%). Em D10, o grupo Indo+PGE₁ apresentou uma taxa de embriões no estadio de BL significativamente mais elevada (37,5%) do que a verificada nos outros tratamentos, Testemunha (0%), Indo (5,9%) e PGE₁ (0%). No estadio de BLE, o grupo Testemunha apresentou uma taxa de embriões significativamente mais baixa (0,0%) que a dos tratamentos com Indo (29,4%) e com PGE₁ (60,0%), tendo este último apresentado uma taxa significativamente mais elevada que a do grupo Indo+PGE₁ (60,0% vs. 16,7%). Relativamente ao estadio EXT, o grupo Testemunha apresentou uma taxa de embriões significativamente superior (100%) às de todos os outros tratamentos, grupo Indo (64,7%), grupo Indo+PGE₁ (45,8%) e grupo PGE₁ (40,0%).

Gráfico 3. Estadio de desenvolvimento embrionário (Experiência 2 - PGE1).



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nas três experiências efectuadas verificou-se que a indometazina incorporada no meio de fertilização provocou uma diminuição significativa das taxas de fertilização dos oócitos bovinos relativamente ao grupo não suplementado, evidenciando assim que existem prostaglandinas essenciais ao mecanismo da fertilização. Os resultados parecem estar de acordo com outros trabalhos em espécies diferentes, nomeadamente em ratinhos (Hayashi e col., 1988). Estes autores verificaram uma diminuição significativa da viabilidade dos espermatozoides de ratinho e da sua taxa de fertilização, quando adicionaram indometazina ao meio de fertilização *in vitro*. Das três prostaglandinas testadas no presente trabalho, verificou-se que a PGE₂ e a PGE₁ conseguiram inverter o efeito da indometazina, aproximando os valores da taxa de fertilização aos dos observados nos grupos testemunhos, parecendo ser necessárias ao mecanismo da fertilização. No entanto, a PGE₁ não consegue recuperar esses valores

quando suplementada isoladamente, sendo provavelmente a sua acção prejudicada pela presença de outras prostaglandinas cuja síntese não foi inibida. Também Aitken e col. (1985, 1986), em humanos, evidenciaram um aumento significativo da taxa de penetração de espermatozóides em oócitos desnudados de hamster, quando incubaram os mesmos em meio com PGE₂ e PGE₁, não se verificando nenhum efeito quando a incubação foi feita com PGF_{2α}. Também no nosso trabalho, a PGF_{2α}, isoladamente ou em associação com a indometazina, não foi capaz de inverter o efeito negativo do inibidor, podendo concluir-se que, a ser sintetizada durante a cultura, esta prostaglandina exerce um efeito negativo directo no mecanismo de fertilização.

Não encontramos resultados na bibliografia relacionados com o efeito que as PG adicionadas ao meio FERT poderão exercer sobre o desenvolvimento embrionário posterior. Apenas Gurevich e col. (1993), em bovinos, apresentaram resultados sobre a síntese de PG por parte dos zigotos durante o período imediatamente pós fertilização até cerca de 48 horas depois. No conjunto das três experiências descritas, podemos concluir que a PGF_{2α} incorporada isoladamente no meio FERT diminuiu a viabilidade dos embriões ao 8º dia do seu desenvolvimento, o que não aconteceu com as restantes PG testadas. Pelo contrário, a presença no meio de outras PG, quando este é suplementado com PGF_{2α} durante a fertilização, neutralizou o seu efeito negativo verificado ao D8. Quanto à qualidade dos embriões em D8, verificou-se que a inibição da síntese das três PG testadas durante a fertilização provocou uma diminuição significativa dos embriões de melhor qualidade (Gr2) na experiência 1 e um aumento dos embriões de pior qualidade (Gr4) na experiência 2 e 3. Apenas a PGE₂ conseguiu melhorar a qualidade dos embriões relativamente ao grupo inibido, chegando mesmo a originar embriões de melhor qualidade que o grupo testemunho, quando adicionada com a Indo no meio de fertilização. As diferenças significativas entre os tratamentos para os diferentes estádios de desenvolvimento nos dias 7 e 8, anularam-se relativamente ao atraso ou avanço do crescimento embrionário dos diferentes grupos nos dias 9 e 10, sugerindo que nesta fase existem factores que neutralizam o efeito dos tratamentos instituídos durante a fase de fertilização.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken, R.J. e Kelly, R.W. 1985. Analysis of the direct effects of prostaglandins on human sperm function. *J.Reprod. Fert.*, 73: 139-146.
- Aitken, R.J., Irvine, S. e Kelly, R.W. 1986. Significance of intracellular calcium and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate in the mechanisms by which prostaglandins influence human sperm function. *J. Reprod. Fert.*, 77: 451-462.
- Baptista, M.C., Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (2000). Effect of prostaglandins on bovine sperm capacitation and fertilisation in vitro. *Theriogenology*, 53(1): 416
- Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Marcus, S., Shore, S. e Shemesh, M. (1993). Prostaglandin production by the oocyte-cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E₂ on the development of the early bovine embryo. *Reprod. Fert. Dev.*, 5: 281-283.
- Harrison, R.A.P. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in Eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 581-594.
- Hayashi, S, Noda, Y. e Mori, T. 1988. Analysis of the role of prostaglandins in the fertilization process. *European Journal of Obstetrics and Reproductive Biology*, 29: 287-297.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. (1997). Efeito das prostaglandinas sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. *Proceedings do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, 3-6 de Julho, Estoril, II, pp. 142-149.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito do soro de vacas em cio superovuladas sobre a produção in vitro de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. *Proceedings do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, 3-6 de Julho, Estoril, II, pp. 128-135
- Okuda, K., Venoyama, Y., Miyamoto, A., Okano, A., Schweigert, F. e Schams, D. (1995). Effects of prostaglandins and oestradiol 17β on oocytocin binding in cultured bovine luteal cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 1045-1051.
- Shalev, Y., Shemesh, M., Levinshal, T., Marcus, S. e Breibart, H. 1994. Localization of cyclooxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 101: 405-413.