

PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA FASE INICIAL DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA EM BOVINOS

EFFECT OF PROSTAGLANDINS ON THE FIRST STAGE OF *IN VITRO* BOVINE SPERM CAPACITATION

M.C. Baptista, C.C. Marques, R.M. Pereira, M.I. Vasques, A.E.M. Horta.

Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional -INIA, 2000-763 Vale de Santarém

RESUMO

A presença do enzima ciclooxigenase responsável pela síntese das prostaglandinas (PGs), na cabeça e peça intermédia de espermatozoides (spz) bovinos, sugere a participação destas moléculas nos processos de maturação dos spz, que condicionam a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário. Pretendeu-se determinar a influência da inibição da síntese das PGs pela indometazina (Indo), da PGF2 α (Indo+PGF2 α) e da PGE1 (Indo+PGE1) suplementadas ao meio de swim-up (CAP: Meio Tyrodes s/ Ca c/ cafeína), sobre a taxa de fertilização, desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. O trabalho desenvolveu-se ao longo de 9 sessões em que foram inseminados 1727 oócitos com sémen tratado da seguinte forma: Grupo testemunha com 417 oócitos, inseminados com spz capacitados em meio CAP sem qualquer suplementação; Grupo Indo com 438 oócitos inseminados com spz capacitados em meio CAP suplementado com Indo (28 μ M); Grupo Indo+PGE1 com 432 oócitos inseminados com spz capacitados em CAP suplementado com Indo (28 μ M) e PGE1 (1,4 x 10⁻⁷ M) e Grupo Indo + PGF2 α com 440 oócitos inseminados com spz capacitados em meio CAP, suplementado com Indo (28 μ M) e PGF2 α (1,4 x 10⁻⁷ M). Foi utilizada uma concentração espermática de 1x10⁶ spz/mL para a inseminação. 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).

Os resultados mostram que a ausência de prostaglandinas (grupo Indo) nesta fase de preparação dos spz prejudica o processo de fertilização, quando comparados com os do grupo testemunha (45,0% vs.54,0%; P<0,009). A PGE1 actuando isoladamente, consegue inverter a acção negativa da Indo (51,2% vs. 54,0%; P>0,05) e a PGF2 α tem um efeito ainda mais prejudicial que a Indo (38,4% vs. 54,0% e 45,0%; P<0,0001 e P<0,05, para o grupo testemunha e Indo, respectivamente). Quanto ao desenvolvimento embrionário verificou-se um atraso no crescimento dos embriões pela ausência das prostaglandinas e quando há desequilíbrios favoráveis à PGF2 α . A inibição da síntese de prostaglandinas durante a fase inicial de capacitação dos spz provocou um decréscimo significativo na qualidade dos embriões face ao grupo testemunha, não tendo nenhuma das prostaglandinas utilizadas conseguido inverter este efeito negativo. Das duas PGs testadas, a PGE1 foi a que apresentou piores resultados relativamente à qualidade de embriões transferíveis. Conclui-se que as prostaglandinas desempenham um papel determinante durante a fase inicial de capacitação espermática *in vitro* com repercussões na taxa de fertilização desenvolvimento e qualidade dos embriões. A PGE1 e a PGF2 α mostraram acções opostas face ao processo de capacitação, com reflexos na fertilização.

SUMMARY

Cyclooxygenase is responsible for prostaglandin (PG) synthesis in bovine sperm head and mid-piece, suggesting that these hormones are present throughout all stages of sperm maturation. Sperm maturation is essential to occur for oocyte fertilisation and embryo development. The purpose of this study was to determine the effect of a PG synthesis inhibitor

(Indomethacin, Indo), PGF2 α (Indo+PGF2 α) and PGE1 (Indo+PGE1), added to the swim-up medium (CAP medium: calcium-free TALP+caffeine), on *in vitro* embryo fertilisation rates and embryo development and quality. Treatments were performed as follows (9 trials, a total of 1727 oocytes inseminated): Control group (417 oocytes inseminated with capacitated sperm in CAP without supplementation); Indo group (438 oocytes inseminated with capacitated sperm in CAP + 28 iM Indo); Indo + PGE1 (432 oocytes inseminated with capacitated sperm in CAP + 28 iM Indo + 1,4 x 10⁻⁷ M PGE1) and Indo+PGF2 α (440 oocytes inseminated with capacitated sperm in CAP + 28 iM Indo + 1,4 x 10⁻⁷ M of PGF2 α). A final sperm concentration of 1x10⁶ sperm/mL was used for insemination. After 22 hours of incubation, embryos were transferred to a co-culture system consisting of 1x10⁶ granulosa cells/mL in 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 indicate that the absence of PG (Indo group) at this stage of sperm maturation had a detrimental effect on subsequent oocyte fertilisation rates (45,0% vs 54,0% in control group; P<0,009). PGE1 in group Indo+PGE1 was able to reverse the negative effect of indomethacin (51,2% vs 54% in control group; P>0,05). PGF2 α had an even higher detrimental effect on fertilisation rates than indomethacin (38,4% vs 54% and 45,0%; P<0,0001 and P<0,05, for control and Indo groups, respectively). Total PG inhibition and supplementation with PGF2 α delayed embryo development. PG inhibition at the first stage of sperm capacitation also lowered embryo quality at D8 of culture as opposed to control group and none of the tested PG could reverse this negative influence. Transferable embryos of group PGE1 presented the worst quality of all groups. We can conclude that prostaglandins play an essential role during the very first stage of *in vitro* sperm capacitation, this effect being extended as far as oocyte fertilisation and embryo development are concerned. PGE1 (+) and PGF2 α (-) have opposite actions upon capacitation mechanisms, influencing oocyte fertilisation rates accordingly.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos tornou-se nos dias de hoje uma técnica de rotina, que envolve os processos de maturação dos gametas feminino e masculino, fertilização e desenvolvimento embrionário. No entanto, as baixas taxas de embriões, 30 a 40% (Hytell e col., 1997), conseguidas com estas técnicas, requerem estudos que permitam um maior conhecimento dos mecanismos de maturação e preparação dos gametas e a sua influência no processo de fertilização e posterior desenvolvimento embrionário.

Estudos realizados no nosso laboratório demonstraram o efeito das prostaglandinas (PGs) nos processos de produção *in vitro*, incluindo a maturação dos oócitos (Marques e col., 1997; Marques, 1998) e a fertilização (Baptista, 2000; Baptista e col., 2000).

A presença do enzima ciclooxygenase responsável pela síntese das PGs, na cabeça e peça intermédia dos espermatozóides (spz) bovinos sugere a participação destas moléculas nos processos de maturação dos spz, que condicionam a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (Shalev e col., 1994). Com este trabalho pretendeu-se determinar o efeito da suplementação de PGs (PGE1 e PGF2 α) ao meio de swim-up bem como a influência da sua inibição pela indometazina (Indo), um inibidor da sua síntese, sobre as taxas de fertilização, qualidade e desenvolvimento dos embriões produzidos.

MATERIAL E MÉTODOS

A recolha dos ovários foi feita duas vezes por semana no matadouro regional de Santarém, Santacarnes. Logo após o abate das vacas os ovários recolhidos são colocados em garrafas térmicas com uma solução salina fosfatada tamponizada (PBS), a 37°C., à qual é adicionada albumina sérica bovina (BSA) e antibiótico (sulfato de Kanamicina), sendo então transportados para o laboratório num espaço máximo de 2 horas após a recolha.

No laboratório procede-se à aspiração dos folículos com 2-6 mm de diâmetro para obtenção do complexo cumulus-oócito e das células da granulosa utilizadas na elaboração das monocamadas para o suporte e desenvolvimento dos embriões.

Os oócitos primários seleccionados são transferidos para placas de cultura contendo 3 ml de meio de maturação de oócitos, W1(TCM 199 + 10% de soro de vaca em cio superovulada, SOCS, + antibióticos) indo então a incubar em estufa com 5% de CO₂ saturada de humidade e a 39°C de temperatura durante 22 a 24 horas. Após este período de tempo apenas os oócitos com elevado grau de expansão das células do cumulus seguiram para a fertilização, sendo inseminados (1 x 10⁶ spz/ml) com sêmen bovino descongelado e sujeito a um processo de capacitação *in vitro* pelo método de swim-up em meio CAP (TALP com cafeína, 485,5 ig/ml).

Durante o processo de swim-up foram feitos os seguintes grupos:

Grupo Controlo - 417 oócitos inseminados com sêmen sem qualquer tratamento;

Grupo Indo - 438 oócitos inseminados com spz capacitados em meio CAP suplementado com Indo na dose de (2,8 x 10⁻⁵ M);

Grupo Indo + PGF2 α - 440 oócitos inseminados com spz capacitados em meio CAP suplementado com Indo na dose de 2,8 x 10⁻⁵ M + PGF2 α na dose de 1,4 x 10⁷ M;

Grupo Indo + PGE1 - 432 oócitos inseminados com spz capacitados em meio CAP suplementado com Indo na dose de 2,8 x 10⁻⁵ M + PGE1 na dose de 1,4 x 10⁷ M.

O processo de fertilização realizou-se em gotas de 40 μ l durante 22 horas e após este período de tempo os oócitos inseminados foram transferidos para placas de cultura com monocamada de células da granulosa e 48 horas após a inseminação foi determinada a clivagem sendo o desenvolvimento acompanhado até à fase de extrusão.

O efeito dos tratamentos foi determinado pela taxa de clivagem, pelo nº de embriões produzidos entre os 7 - 10 dias, (D7-D10) e pela qualidade dos embriões produzidos ao 8º dia. A qualidade dos embriões é avaliada segundo uma escala que varia entre o grau 1 (G1), que se refere a embriões excelentes sem sinais de degenerescência e em que o seu estadió de desenvolvimento corresponde à sua idade e grau 4 que se refere aos embriões degenerados ou com atrasos elevados no seu desenvolvimento. Foi utilizado o teste do qui - quadrado no tratamento dos resultados.

RESULTADOS

A indometazina adicionada ao meio CAP (Fig. 1) provocou uma diminuição significativa nas taxas de fertilização quando comparada com o grupo controlo (45% vs. 54%) e Indo + PGE1 (45% vs. 51,2%) P<0,05. A PGF2 α potencializou o efeito negativo da Indo ao apresentar valores significativamente mais baixos quer em relação ao grupo Indo (38,4% vs. 45%) quer em relação ao grupo testemunha (38,4% vs. 54%) P< 0,05. A PGE1 consegue inverter o efeito negativo da Indo ao apresentar valores das taxas de fertilização significativamente mais elevados relativamente ao grupo Indo (51,2% vs. 45%) P = 0,068 e ao aproximar-se dos valores observados para o grupo controlo (51,2% vs. 54%) P > 0,05.

Relativamente à dinâmica de desenvolvimento dos embriões (Fig.2) verificou-se existir um atraso no seu crescimento nos grupos Indo (em D9, no estadió de JBL o grupo Indo apresentou uma taxa de embriões significativamente mais elevada que os grupos controlo 12,5% vs.0% P>0,01 e Indo + PGE1 12,5% vs. 0% P<0,02). Em D10 o grupo da Indo apresentou também uma taxa de embriões no estadió de BLE significativamente superior ao grupo controlo (72,2% vs. 42,4%, P<0,04) enquanto que em embriões extrusados é o grupo que apresenta um número de embriões significativamente mais baixo que o grupo controlo (27,8% vs. 57,6%, P<0,04).

Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a qualidade dos embriões em D8 (Fig.3) verificou-se que em embriões de grau 2 (embriões de boa qualidade e transferíveis), o grupo da Indo apresentou um número de embriões significativamente inferior relativamente ao grupo controlo (8,6% vs.17,6%, P<0,02). Em G3 o grupo testemunha apresentou um número de embriões significativamente mais elevado que o grupo Indo + PGE1 (51,0% vs. 26,3%, P<0,01) e entre os grupos Indo + PGF2 α e Indo + PGE1 (54,2% vs.26,3%, P<0,02). Em G4 o grupo

testemunha apresentou uma % de embriões significativamente mais baixa do que a observada nos tratamentos com Indo (27,5% vs.48,6%, $P<0,04$), e com Indo + PGE1 (27,5% vs.47,4%, $P<0,05$).

Figura 1. Efeito das prostaglandinas no maço CAP sobre a taxa de fertilização *in vitro*.

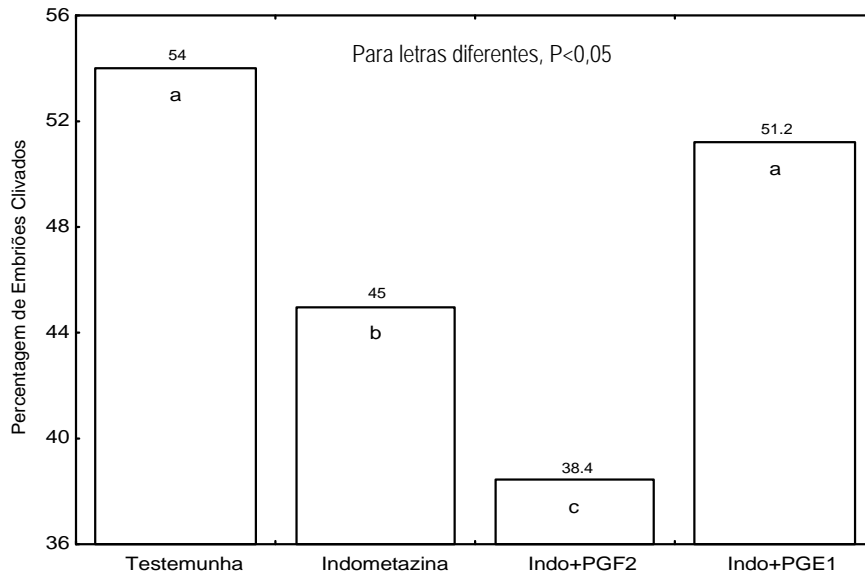


Figura 2. Estádios de desenvolvimento embrionário

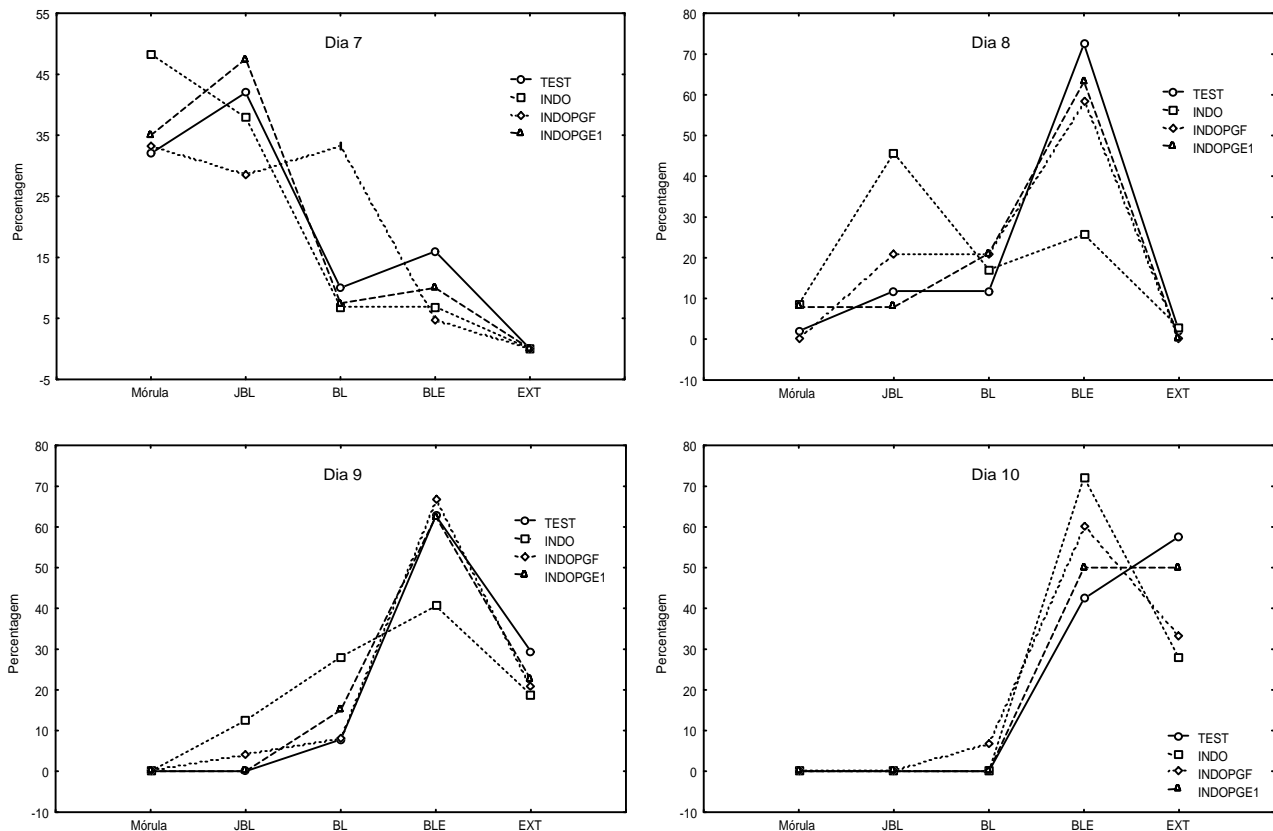
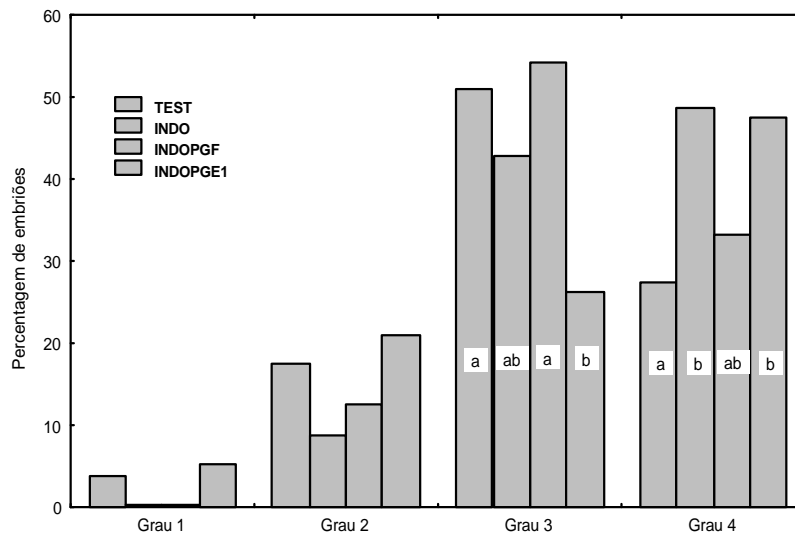


Figura 3. Qualidade dos embriões ao 8º dia de cultura



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Trabalhos realizados evidenciaram em bovinos a presença nos spz do enzima ciclooxigenase, essencial para a síntese de prostaglandinas e que a sua localização anatómica (cabeça e/ou peça intermédia) sugere que as PGs participam em diferentes funções (Shalev e col., 1994). A síntese de prostaglandinas na cabeça e peça intermédia dos spz poderá estar associada com a reacção acrossómica (Joyce e col., 1987), enquanto que a sua síntese na peça intermédia poderá estar relacionada com os processos metabólicos de produção de energia relacionados com a motilidade dos spz (Cohen e col., 1977; Schlegel e col., 1981).

Em humanos (Aitken e col., 1985, 1986) evidenciaram um aumento significativo da taxa de penetração de spz em oócitos desnudados de hamster, ao incubarem os spz em meio com PGE1 e PGE2, não tendo verificado nenhum efeito quando a incubação foi feita com PGF2 α . Esse aumento estaria relacionado com a subida dos níveis intracelulares de Ca²⁺ verificada na presença das PGE1 e PGE2, o qual não foi encontrada para a PGF2 α .

Os trabalhos citados parecem estar de acordo com os resultados que encontramos para a espécie bovina, sugerindo que a ausência de PGs nesta fase de preparação dos spz é prejudicial ao processo de fertilização e que há prostaglandinas que actuando isoladamente, uma beneficiam este processo (PGE1) enquanto outras são prejudiciais, como é o caso da PGF2 α .

Quanto ao efeito dos tratamentos no meio CAP sobre o desenvolvimento embrionário verificámos existir um atraso no crescimento dos embriões nos grupos Indo e Indo + PGF2 α , sugerindo que a inibição das prostaglandinas nesta fase de preparação dos spz para a fertilização bem como a PGF2 α têm influência negativa na velocidade de crescimento e posterior desenvolvimento. É provável que os desequilíbrios na síntese das PGs provocados durante a fase inicial de capacitação dos spz, possam provocar alterações susceptíveis de vir a condicionar mais tarde o normal funcionamento da via reguladora da mobilização do cálcio citoplasmático das células embrionárias.

A inibição da síntese de PGs provocou um decréscimo significativo na qualidade dos embriões face ao grupo controlo. Das PGs estudadas a ausência de recuperação de valores face ao grupo controlo e Indo indica-nos haver outras PGs sintetizadas naturalmente e/ou outros factores não identificados que nesta fase são essenciais para a posterior qualidade dos embriões. A PGE1 demonstrou mesmo ser uma das PGs prejudiciais.

Como conclusão deste trabalho, verificámos que as PGs parecem ser essenciais ao processo de fertilização nesta fase de preparação dos spz, uma vez que a inibição da sua

síntese provocou um decréscimo significativo nas taxas de fertilização. Das PGs estudadas a PGE1 é a que consegue inverter o efeito negativo da Indo ao aproximar os valores das taxas de fertilização aos verificados para o grupo controlo parecendo ser uma das PGs essencial nesta fase enquanto que a PGF2 α demonstrou ter um efeito muito negativo. Desequilíbrios a se favor da PGF2 α .provocaram nesta fase taxas de fertilização bastante baixas.

Quanto ao desenvolvimento embrionário há um efeito negativo marcado pela ausência de PGs bem como por desequilíbrios favoráveis à PGF2 α .

A qualidade dos embriões foi prejudicada pela inibição da síntese de PGs e a PGE1 mostrou mesmo ter um efeito negativo sobre a qualidade dos embriões.

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., 2000. Efeito de sémen de touros diferentes e das prostaglandinas sobre a fertilização *in vitro* em bovinos. Dissertação para prestação de provas públicas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. EZN-INIA, Vale de Santarém.
- 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.
- Cohen, M.S., Colin, M.J., Golimbu, M. e Hotchkiss, R.S.. 1977. The effects of prostaglandins on sperm motility. Fert. Steril., 28, 78-85.
- Hytell, P., Fair, T., Callesen, H. e Greve, T.1997. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, 47(1), 23-32.
- Joyce, C.L., Nuzzo, N.A., Wilson, L.Jr. e Zaneveld, L.J.D. 1987. Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. J. Androl., 8, 74-82.
- Marques, C.C. 1998. Contribuição ao estudo da maturação de oócitos e cultura de embriões bovinos *in vitro*. Dissertação para prestação de provas públicas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. EZN-INIA, Vale de Santarém.
- 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.
- Schlegel, W., Rotermund, S., Faber, G. e Neischlag, 1981. The influence of prostaglandins on sperm motility. Prostaglandins, 21, 87-99.
- 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.