



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO E
ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA SEU USO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS**

ANDRIELLE THAINAR MENDES CUNHA

BRASÍLIA - DF

2019

ANDRIELLE THAINAR MENDES CUNHA

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA SEU USO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientadora: Margot Alves Nunes Dode

BRASÍLIA - DF

2019

ANDRIELLE THAINAR MENDES CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO E
ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA SEU USO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Aprovada em 12/04/2019.

Banca examinadora:

Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora Embrapa/UnB)

Dra. Carolina Madeira Lucci (Membro Interno/UnB)

Dr. Carlos Frederico Martins (Membro Externo/Embrapa)

Dr. Maurício Machaim Franco (Membro Externo/Embrapa)

BRASÍLIA - DF

2019

“Tem gente que tem cheiro de colo de Deus. De banho de mar quando a água é quente e o céu é azul. Ao lado delas, a gente não acha que o amor é possível, a gente tem certeza.

Tem gente que tem cheiro de café sem pressa. Do brinquedo que a gente não largava. De passeio no jardim. Ao lado delas, a gente lembra que no instante em que rimos Deus está dançando conosco de rostinho colado.

Costumo dizer que algumas almas são perfumadas, porque acredito que os sentimentos também têm cheiro. Minha avó era alguém assim. Ela perfumou muitas vidas com sua luz e suas cores. A minha, foi uma delas.”

(Ana Jácomo)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre iluminar e abençoar o meu caminho.

Aos meus **pais, Roberto e Cleia**, e à minha madrastra **Suely**, pelo apoio em todos os momentos. Por serem meu alicerce e sempre acreditarem nos meus sonhos junto a mim. Obrigada por todo o incentivo, amor, apoio e compreensão.

Ao meu companheiro, **Victor Araújo**, por todo o amor e amizade, motivação, parceria e muita paciência em todos os momentos.

Aos meus **amigos e familiares**.

À minha orientadora **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, pela orientação deste projeto. Pelos ensinamentos diários durante todos esses anos de convívio. Por todas as oportunidades confiadas a mim, pela amizade, viagens, pelos “puxões de orelha” e conversas que muito me ensinaram. Obrigada por me mostrar que sempre posso ir além do que imagino.

A todos os meus amigos de laboratório, especialmente **Ana Luiza, Ana Cristina, Felipe, Ligiane, Gabriela, Nayara e Luzia**. Obrigada por toda a ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de distração. Ao **José Carvalho**, sou grata pela amizade e diversos ensinamentos práticos e teóricos desde que cheguei ao Cenargen.

Ao Dr. **Luciano Paulino da Silva**, pela ajuda com as análises de microscopia de força atômica, e ao Dr. **João Henrique Viana** pelas análises estatísticas.

Ao Dr. **Carlos Frederico Martins, Daniela Brandão, Heidi, Elisa, Carol e George**. Obrigada pelos ensinamentos, oportunidades, e por despertarem em mim a paixão pelo trabalho desenvolvido dentro do laboratório.

Aos **funcionários** e grupo de **pesquisadores** do LRA, sem os quais não seria possível o dia a dia.

Ao **CNPq, CAPES, FAP-DF e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** pelo apoio financeiro durante o curso.

À **Universidade de Brasília**, pelo curso oferecido. Aos **funcionários** da secretaria de pós-graduação do IB e à professora **Carolina Lucci**, sempre muito solícitos e atenciosos.

ÍNDICE

| Capítulos/subcapítulos | Páginas |
|--|---------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| INTRODUÇÃO | 2 |
| OBJETIVOS | 4 |
| HIPÓTESE | 4 |
| REVISÃO LITERÁRIA | 5 |
| Espermatozoides | 5 |
| Epidídimo | 7 |
| Alterações espermáticas durante o trânsito epididimário: maturação | 8 |
| Plasma Seminal e Espermatozoides: Formação do sêmen | 12 |
| Reservatório da tuba uterina | 13 |
| Capacitação Espermática | 14 |
| Avaliações da viabilidade espermática | 15 |
| Fecundação | 19 |
| Uso de espermatozoides do epidídimo na produção in vitro de embriões | 21 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |
| CAPÍTULO 2 | 41 |
| RESUMO EXPANDIDO | 42 |
| RESUMO | 42 |
| INTRODUÇÃO | 42 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| RESULTADOS | 45 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| ARTICLE 1..... | 50 |
| ABSTRACT | 50 |
| INTRODUCTION..... | 51 |
| RESULTS..... | 53 |
| DISCUSSION | 62 |
| MATERIALS AND METHODS | 66 |
| REFERENCES | 74 |
| CAPÍTULO 3 | 78 |
| RESUMO EXPANDIDO..... | 79 |
| RESUMO | 79 |
| INTRODUÇÃO | 79 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 81 |
| RESULTADOS | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |
| ARTICLE 2..... | 88 |
| ABSTRACT | 88 |
| INTRODUCTION | 89 |
| MATERIALS AND METHODS | 90 |
| RESULTS..... | 93 |
| DISCUSSION..... | 96 |
| REFERENCES | 98 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 101 |

RESUMO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo (EP) permite o uso de gametas que seriam perdidos devido a morte ou falhas na capacidade reprodutiva de animais. Os EP diferem dos espermatozoides do ejaculado (EJ) por não serem expostos ao plasma seminal, essas diferenças fisiológicas podem interferir em fatores como a longevidade, vias de capacitação e potencial de fecundação. Portanto para que se possa estabelecer os procedimentos mais adequados para o uso eficiente de EP na produção in vitro de embriões (PIVE), melhor conhecimento sobre seu comportamento morfofisiológico é necessário. O presente estudo objetivou identificar o comportamento fisiológico de EP durante o processo de PIVE, estabelecer melhorias no protocolo de PIVE ao utilizar EP e, caracterizar morfológicamente os EP. EP e EJ foram coletados de sete touros Gir e utilizados em cinco experimentos. No Experimento 1 foi avaliado o efeito da suplementação com heparina (EP+) na longevidade e viabilidade espermática, e no experimento 2 a influência da heparina nas taxas de fecundação (TF). No experimento 3, dois gradientes descontínuos (Percoll e PureSperm) foram testados na PIVE, e sua influência no sexo dos embriões foi avaliada. O experimento 4 foi realizado para avaliar o tempo necessário que EP precisam para atingir o máximo de ovócitos fecundados, para isto, diferentes tempos de co-incubação (3, 6, 12 e 18h) foram propostos. Por fim, no experimento 5 foi realizada a caracterização morfológica de EP utilizando a microscopia de força atômica (MFA). Os dados obtidos nos experimentos 1 e 5 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de comparação múltipla de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$), além disso uma análise dos componentes principais foi realizada no experimento 5. Os resultados da TF e produção embrionária foram analisados pelo Qui-quadrado ($P \leq 0,05$) e a sexagem embrionária pelo teste de Wilcoxon ($P \leq 0,05$). Os experimentos 1 e 2 mostraram que a heparina afetou a viabilidade, longevidade e o tempo necessário para EP fecundar os ovócitos. Após 6h, o grupo EP+ já havia fecundado 82% dos ovócitos, sendo superior aos grupos EJ (19%) e EP (42%). Às 12 e 18h, a TF permaneceu mais alta no grupo EP+, e um aumento gradual na polispermia foi observado. No Experimento 3, o uso de gradientes para a seleção espermática de EP apresentou maior produção embrionária (Percoll 54%; PureSperm 52%) do que o observado no método de lavagem (37%), após sete dias de cultivo embrionário. Os embriões produzidos por EP selecionados em gradiente resultaram e um desvio de sexo em favor de embriões machos. Em relação ao tempo necessário para co-incubação analisado no experimento 4, não foram observadas diferenças entre os grupos. Os dados obtidos na MFA, experimento 5, mostraram que as dimensões uni, bi e tri dimensionais não diferiram entre os grupos EP e EJ. Entretanto, os descritores de forma mostram que o grupo EP apresentou maior rugosidade e alongamento, e menor fator de forma e taxa de circularidade. Concluindo, ao utilizar EP o tempo de fecundação in vitro pode ser reduzido para 6h sem afetar a produção e qualidade do embrião, a seleção espermática do EP pode ser realizada utilizando Percoll ou PureSperm, no entanto, um desvio de sexo nos embriões produzido foi observado. Quanto às características morfológicas, EP e EJ coletados dos mesmos reprodutores são morfológicamente semelhantes em 19 dos 24 parâmetros avaliados, indicando que ausência de plasma seminal não afeta a morfologia de EP.

Palavras-chave: Sêmen; Biotecnologia; Heparina; Viabilidade Espermática; Fecundação in vitro.

ABSTRACT

The recovery of sperm from the epididymis tail (EP) allows the use of gametes that would be lost due to death or failures in the reproductive capacity of animals. EP differ from ejaculate spermatozoa (EJ) because they are not exposed to seminal plasma, these physiological differences can affect factors such as longevity, pathways of capacitation and fertilization potential. Therefore, in order to establish the most appropriate procedures for the efficient use of EP in the in vitro production of embryos (IVEP), better knowledge about its morphological and physiological behavior is necessary. The present study aimed to identify the physiological behavior of EP during the IVEP process, to can establish improvements in their protocol when EP is using, and to characterize the morphologically of the EP. EP and EJ were recovery from seven Gir bulls and used in five experiments. Experiment 1: the effect of heparin supplementation (EP+) on longevity and sperm viability was evaluated, after which the influence of heparin on fertilization rates (FR) was tested (experiment 2). In experiment 3, two discontinuous gradients (Percoll and PureSperm) were tested in IVEP, and their influence on the sex of the embryos was evaluated. Experiment 4 the time needed for EP to reach the maximum number of fertilized oocytes was evaluated, different co-incubation times (3, 6, 12, and 18h) were proposed. Finally, for the morphological characterization of EP using atomic force microscopy (AFM), experiment 5 was developed. Thus, with the objective of establishing improvements in the IVEP protocol using EP, physiological differences in the behavior of EP during the IVEP process and their morphological characterization were evaluated. The data obtained in experiments 1 and 5 were submitted to an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer multiple comparison ($P \leq 0.05$) and a principal component analysis was made for the results of experiment 5. The results of the FR rate and embryo production were analyzed by the Chi-square test ($P \leq 0.05$) and the embryo sex was analyzed through the Wilcoxon test ($P \leq 0.05$). Experiments 1 and 2 showed that heparin affected the viability, longevity, and time required for EP fertilize oocytes. After 6h, the EP+ group had fertilized 82% of the oocytes, being superior to the EJ (19%) and EP (42%). At 12 and 18h, FR remained higher in the EP+, and a gradual increase in polyspermy was observed. Experiment 3: the use of gradients for the selection of EP showed higher embryo production (Percoll 54%; PureSperm 52%) than that observed in the washing method (37%) after seven days of embryo culture. Embryos produced using EP selected in gradients resulted in a gender deviation in favor of male embryos. Regarding the time required for co-incubation analyzed in experiment 4, no differences were observed between the groups. The data obtained in the AFM analysis in experiment 5 showed that the one, two and three dimensional measurements did not show differences between the EP and EJ groups. However, the shape descriptors show that the EP group presented higher roughness and elongation, and lower form factor and circularity rate. In conclusion, in vitro fertilization time can be reduced to 6h without affecting embryo production and quality, the spermatic selection of EP can be performed using Percoll or PureSperm; however, a gender deviation in the produced embryos was observed. Concerning the morphological characteristics observed, EP and EJ collected from the same sire presented similar morphological characteristics in 19 of the 24 parameters evaluated, indicating that absence of seminal plasma does not affect the morphology of EP.

Key words: Semen; Biotechnology; Heparin; Sperm Viability; In Vitro Fertilization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Análise dos componentes principais

AMPC – Adenosina-monofosfato-cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BSP-A1 – *Binder sperm protein A1*

BSP-A3 – *Binder sperm protein A3*

BSP-A5 – *Binder sperm protein A5*

BSPs – *Binder sperm proteins*

Ca₂₊ – Cálcio

CASA – *Computer-assisted semen analysis*

CCOs – Complexo cumulus ovócito

CTC – Hidroclorido de clortetraciclina

DCXR – *Dicarbonil lxyulose redutase*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EJ – Espermatozoides do ejaculado

EJ+H – Espermatozoides do ejaculado suplementados com heparina

ELSPB1 – Proteína epididimária de ligação espermática 1

EP – Espermatozoides recuperados do epidídimo

EP+H – Espermatozoides do epidídimo suplementados com heparina

EP-H – Espermatozoides do epidídimo sem a suplementação com heparina

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FIV – Fecundação in vitro

H33258 – *BisBenzimide H33258 trihydrochloride*

H33342 – *BisBenzimide H33342 trihydrochloride*

IA – Inseminação artificial

ICSI – Injeção intracitoplasmática

IP – Iodeto de Propídio

LYSO-G – *LysoTracker Green DND-26*

MFA – Microscopia de força atômica

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

P – Percoll

pH – Potencial hidrogeniônico

PIVE – Produção in vitro de embriões

PKAs – Proteína kinase A

PNA – *Arachis hypogaea lectin*

PS – PureSperm

PSA – *Pisum sativum lectin*

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – *Ribonucleic acid*

SACY – *Soluble adenylyl cyclase*

SCA – *Sperm-class analyzer*

SpTALP – Lactato e piruvato de albumina tyrode

SYBER-14 – *Syber Green 14*

T – spTALP

TRAs – Técnicas de reprodução assistida

TUNEL – Terminal desoxinucleotidil transferase dUTP *nick end labeling*

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Taxa de fecundação de ovócitos inseminados com espermatozoides do ejaculado (EJ), espermatozoides do epidídimo na presença (+) heparina (EP+H) e espermatozoides do epidídimo na ausência (-) de heparina (EP-H) após 3 h, 6 h, 12 h e 18 h de co-incubação.....38

Tabela 2: Taxa de clivagem e produção de blastocistos nos dias 6, 7 e 8 de cultivo utilizando para inseminação espermatozoides do ejaculado selecionados em Percoll (controle), espermatozoides do epidídimo (EP) selecionados em Percoll (EP-P) PureSperm (EP-PS) ou lavado em meio spTALP (EP-spTALP).....39

Tabela 3: Taxa de clivagem e produção de blastocistos nos dias 6 e 7 de cultivo utilizando para inseminação espermatozoides do ejaculado (EJ) e do epidídimo (EP) co-incubados com ovócitos durante 18 horas (EJ 18h; EP 18h), seis horas (EP 6h) ou doze horas (12h).....39

Capítulo 3

Tabela 1: Valores \pm (DP) de medidas uni, bi e tri dimensionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo (EP) e ejaculado (EJ) avaliados por microscopia de força atômica.....77

Tabela 2: Valores \pm (DP) de medidas dos descritores de forma de espermatozoides recuperados do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) avaliados por microscopia de força atômica.....78

LISTA DE FIGURAS**Capítulo 3**

Figura 1: Análise dos componentes principais dos espermatozoides recuperados do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) utilizando medidas uni, bi e tri dimensionais (A) e descritores de forma (B). Cada ponto representa um touro em cada grupo. A análise foi realizada utilizando 20 espermatozoides por touro/grupo, com um total de 140 espermatozoides por grupo.....78

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO LITERÁRIA

INTRODUÇÃO

Material genético de animais de interesse econômico, animais silvestres ou em perigo de extinção pode ser perdido a qualquer momento por morte inesperada, ou por incapacidade reprodutiva adquirida. Estas situações, na maioria das vezes, causam uma perda de material genético importante e também um prejuízo econômico. Portanto, esforços têm sido feitos para desenvolver alternativas que permitam a utilização desse material, evitando assim a sua perda definitiva. De fato, várias técnicas de reprodução assistida (TRAS) estão atualmente disponíveis e são ferramentas importantes para viabilizar o armazenamento e uso futuro desse material.

A recuperação e criopreservação de espermatozoides do epidídimo (EP) de animais mortos é uma dessas alternativas, pois permite a preservação de gametas masculinos e a manutenção de bancos de germoplasma (Kaabi *et al.*, 2003; Martinez-Pastor *et al.*, 2005). Esses espermatozoides podem ser utilizados na inseminação artificial (IA) ou na produção in vitro de embriões (PIVE), seja por injeção intracitoplasmática (ICSI) ou por fecundação in vitro (FIV) (Martins *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016).

Após deixarem os testículos os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo e, no momento da ejaculação, entram em contato com os fluidos secretados pelas glândulas acessórias, formando o sêmen. Essas secreções das glândulas acessórias contêm vários fatores, incluindo íons, lipídios, substratos energéticos, compostos orgânicos e proteínas (Moura *et al.*, 2006; Juyena e Stelletta, 2012) que são importantes para a sobrevivência e transporte do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea (Juyena e Stelletta, 2012). Além disso, proteínas secretadas no plasma seminal são fatores importantes para a estabilidade da membrana, formação do reservatório do istmo, capacitação espermática e interação espermatozoide-ovócito (Ignotz *et al.*, 2001; Gwathmey *et al.*, 2006; Juyena e Stelletta, 2012).

Portanto, os EP diferem dos espermatozoides do ejaculado (EJ), principalmente por não terem entrado em contato com os fluidos das glândulas acessórias. E, por sua vez, não tiveram contato com substâncias que são importantes para a sobrevivência e a capacidade de fecundar, o que pode afetar a fisiologia e longevidade dessas células. De fato, estudos têm mostrado que os EP são mais resistentes que os EJ, apresentando maior viabilidade após a refrigeração e maior longevidade após o descongelamento (Cunha *et al.*, 2016). Além disso, EP parecem

responder de maneira diferente à capacitação *in vitro*, sendo capaz de fecundar ovócitos suínos e bovinos em menor tempo (Matas *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2019).

Considerando esses resultados, pode-se supor que outros aspectos como a morfologia espermática também sejam diferentes entre EP e EJ. Essas diferenças, caso existentes, precisam ser levadas em consideração quando EP sejam utilizados nas TRAS.

Os EP já foram utilizados na IA em bovinos, sejam eles armazenados à temperatura ambiente logo após a castração e coleta (Bertol *et al.*, 2016), após a refrigeração ou após serem criopreservados (Martins *et al.*, 2007), resultando em prenhez ou gerando o nascimento de bezerros. Além disso, diversos estudos já relataram o uso de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo para a PIVE (Fraser e Drury, 1976; Martins *et al.*, 2007; Matas *et al.*, 2010; Krishnakumar *et al.*, 2011; Stout, 2012; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016).

No entanto, os resultados de produção de embriões bovinos quando se utiliza EP são variáveis e contraditórios. Alguns autores relatam taxas de blastocisto similares àquelas obtidas com o uso de EJ (Martins *et al.*, 2009; Stout, 2012; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016) outros relatam taxas inferiores (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016). A variação nos resultados de produção de embriões na PIVE com EP pode ser devido ao fato de que os EP são submetidos à protocolos de preparação espermática estabelecidos para EJ, desconsiderando, assim, as diferenças fisiológicas entre EP e EJ. Portanto, para que se possa obter melhores resultados e usar de forma mais eficiente os EP, estudos que avaliem as características morfofisiológicas deste tipo específico de espermatozoides são necessários, para então propor mudanças que maximizem os resultados quando EP são utilizados em TRAS como a PIVE.

Este estudo tem como objetivo estabelecer o melhor protocolo para utilização de EP na PIVE. Desta forma, o comportamento de EP foi avaliado diante de vários fatores envolvidos na preparação espermática para a PIVE, como o efeito da heparina no comportamento e viabilidade dos EP, a influência de diferentes métodos de seleção espermática, o efeito de diferentes tempos de co-incubação de espermatozoides-ovócitos na produção de embriões. Além disso, a caracterização morfológica de EP utilizando a microscopia de força atômica (MFA) foi realizada.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estabelecimento de protocolo para utilização de EP na PIVE.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da heparina na viabilidade e longevidade de EP após a sua incubação em meio FIV;
- Avaliar a influência da heparina nas taxas de fecundação de EP;
- Avaliar a influência no método de seleção espermática na produção e no sexo de embriões PIVE;
- Avaliar o efeito do tempo de co-incubação de EP com ovócitos na PIVE;
- Caracterizar morfológicamente os EP por microscopia de força atômica.

HIPÓTESE

Espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo são diferentes fisiológica e morfológicamente dos espermatozoides do ejaculado, sendo necessário o uso de protocolos específicos para a PIVE.

REVISÃO LITERÁRIA

Espermatozoides

Os espermatozoides são células haploides, alongadas e constituídas de dois componentes principais: cabeça e cauda, unidas pela região do colo (Flesch e Gadella, 2000). Três membranas estão presentes no gameta masculino: membrana nuclear, membrana acrossomal (interna e externa) e membrana plasmática (Barth e Oko, 1989).

A cabeça do espermatozoide possui formato arredondado e achatado, contendo na porção superior, o acrossoma, e sendo constituída basicamente pelo núcleo e uma pequena quantidade de citoplasma (Flesch e Gadella, 2000). As dimensões e formato da cabeça dos espermatozoides podem variar de acordo com a espécie. Além disso, a população de espermatozoides de um mesmo ejaculado pode apresentar características morfológicas heterogêneas, normalmente imperceptíveis em avaliações morfológicas de rotina (Rubio-Guillén *et al.*, 2007; Ramon *et al.*, 2014).

Quanto à morfologia dos espermatozoides, utilizando a microscopia de luz associada a um sistema computadorizado de análise morfológica, o Sperm-Class Analyzer (SCA), três subpopulações de células espermáticas foram classificadas após o descongelamento de acordo com o tamanho e forma da célula (Rubio-Guillén *et al.*, 2007). As dimensões espermáticas observadas neste estudo apresentaram espermatozoides com área entre 32,15 μm^2 a 42,02 μm^2 . Em estudos um pouco mais recentes realizados por Carvalho *et al.* (2013), a microscopia de força atômica foi utilizada para a comparação morfológica de características como formato e tamanho entre espermatozoides portadores do cromossomo X e Y. Os resultados mostraram dimensões de área entre de 46,9 μm^2 a 49,4 μm^2 , não havendo diferença no tamanho entre os grupos estudados.

O núcleo do espermatozoide é envolto pelo envelope nuclear e possui uma cromatina altamente condensada devido a um evento conhecido como protaminação (Flesch e Gadella, 2000), onde protaminas substituem as histonas do DNA, levando a uma condensação acentuada da cromatina (Balhorn, 2007). A troca de histonas por protaminas ocorre durante o processo final da formação das espermátides, a espermiogênese, e pode ser definida em duas etapas. Inicialmente, proteínas de transição substituem aproximadamente 90% das histonas, em

seguida, as proteínas de transição são substituídas por protaminas (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). A quantidade de histonas que permanecem no DNA determina o grau de condensação e estabilidade da cromatina, sendo que esta característica é específica em cada espécie, sendo que em humanos aproximadamente 15% das histonas permanecem no DNA (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). Como consequência dessas modificações proteicas na arquitetura nuclear durante a espermiogênese, a capacidade de transcrição e tradução da célula espermática passa a ser restrita.

Na região superior da cabeça do espermatozoide está localizado o acrossoma, formado por duas membranas, interna e externa, contendo em seu interior glicoproteínas, açúcares, e enzimas como a hialuronidase e acrosina, as quais são liberadas após a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida do ovócito. Essa ligação induz a reação acrossomal, em que membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem, formando poros para que sejam liberadas as enzimas importantes para que o espermatozoide possa digerir a zona pelúcida. Desta forma, o acrossoma pode ser definido como uma vesícula secretora modificada, oriunda do complexo de Golgi (Flesch e Gadella, 2000; Gilbert, 2003).

A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica anfipática com faces interna e externa, as quais estão associadas proteínas, glicoproteínas, colesterol e glicolipídios. Estes diferentes componentes formam um grande mosaico fluido, altamente organizado, que recobre o acrossoma e toda a célula espermática. A membrana plasmática atua como uma barreira seletiva para componentes presentes no meio intra e extracelular. Cada região da membrana possui sítios de ligação com afinidades altamente específicas a determinadas moléculas (Gwathmey *et al.*, 2006). Sendo assim, a membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide, sendo que eventos que modifiquem sua estrutura comprometem a sua função, levando a perda da viabilidade e longevidade no trato reprodutivo da fêmea, e, conseqüentemente, afetando a capacidade fecundante do espermatozoide.

A cauda da célula espermática é composta de colo ou pescoço e peças intermediária, principal e terminal. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda (Knobil e Neill, 2006). A cauda é formada pelo axonema central, uma estrutura composta por nove pares de

microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois microtúbulos centrais (Mortimer, 2000). Entretanto, à medida que se tornam mais distais, os túbulos duplos vão se dissociando e desaparecendo, sendo que o último a desaparecer é o túbulo central (Barth e Oko, 1989). Na peça intermediária, o axonema é circundado por um conjunto de mitocôndrias dispostas em espiral, que possuem a função de fornecer energia para o batimento flagelar, através da produção de ATP.

Cada região da membrana plasmática contém domínios e funções específicas. A região que recobre a cabeça do espermatozoide tem como função interagir com o ovócito; a região que recobre a peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias, está envolvida no influxo de cálcio (Singh e Rajender, 2015; Vicente-Carrillo *et al.*, 2016) e produção de energia, agindo como um dos desencadeadores da motilidade (Flesch e Gadella, 2000). As proteínas presentes nos diferentes sítios da membrana plasmática possuem funções distintas, como por exemplo o efluxo do colesterol (Thérien *et al.*, 1998) e a ligação à zona pelúcida (Harkema *et al.*, 2004).

A fluidez e permeabilidade da membrana estão diretamente relacionadas com a composição lipídica (Alberts *et al.*, 1994), quantidade de colesterol, níveis de saturação de ácidos graxos e proteínas presentes (Wolfe *et al.*, 1998), assim como pela temperatura a qual a membrana é exposta (Alberts *et al.*, 1994; Flesch e Gadella, 2000). A preservação de todas as estruturas da célula espermática é importante para que ocorra a fecundação e a formação do zigoto.

Depois de deixar os testículos, os espermatozoides ainda não adquiriram a capacidade de se mover progressivamente sendo incapazes de fecundar ovócitos em condições normais de reprodução. Para se tornarem aptos a fecundar, dois processos são necessários, a maturação que ocorre no epidídimo e a capacitação que ocorre no trato reprodutivo da fêmea.

Epidídimo

Após saírem dos túbulos seminíferos, os espermatozoides seguem em direção ao epidídimo. O epidídimo é formado por um ducto enovelado que fica localizado entre o ducto aferente e o deferente e em bovinos pode atingir até 40 metros de comprimento. Os

espermatozoides transitam pelo epidídimo por um período de aproximadamente nove a 13 dias (Dacheux e Dacheux, 2014).

Anatomicamente o epidídimo de bovinos pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda, sendo que essa divisão anatômica é extremamente importante, uma vez que cada região exerce um papel no processo de maturação da célula espermática. O epidídimo é composto por um epitélio onde diferentes tipos de células epiteliais são descritos, incluindo células principais, células estreitas (encontradas apenas no segmento inicial), células claras e células basais (Dacheux e Dacheux, 2014; Paunescu *et al.*, 2014). Cada um desses tipos de células possui uma estrutura e função específicas que variam dependendo de sua localização ao longo do epidídimo, atuando na secreção, absorção, acidificação do líquido luminal, proteção contra resposta imune, fagocitose, produção de antioxidantes e proteínas (Caballero *et al.*, 2009).

A cabeça do epidídimo é formada por epitélio pseudoestratificado, com lúmen estreito, cílios altos e presença de baixa quantidade de espermatozoides. O corpo do epidídimo é composto por um epitélio pseudoestratificado, com cílios encurvados e alguns vacúolos apresentando maior lúmen. O ambiente da cauda do epidídimo possui epitélio pseudoestratificado, com poucos cílios e um lúmen amplo contendo a maior concentração de espermatozoides (Schimming *et al.*, 2012). Ao final do trânsito pelo epidídimo, os gametas masculinos maduros são armazenados na cauda.

Alterações espermáticas durante o trânsito epididimário: maturação

A maturação abrange importantes alterações morfológicas e fisiológicas, envolvendo mudanças sequenciais na composição bioquímica da célula espermática. Cada segmento do epidídimo apresenta características distintas, como a população de células, expressão diferencial de genes e, conseqüentemente, perfil de proteínas (Gervasi e Visconti, 2016). Durante o trânsito no epidídimo importantes modificações espermáticas são descritas, como a diminuição na proporção de colesterol e fosfolipídios da membrana, mudanças no perfil de proteínas, condensação final da cromatina, trânsito da gota citoplasmática localizada na região proximal para a região distal, aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de fecundação (Cornwall, 2009; Dacheux e Dacheux, 2014; Gervasi e Visconti, 2017).

A primeira porção do epidídimo, a cabeça, está relacionada com a reabsorção da maioria dos fluidos provenientes dos túbulos seminíferos. Após a reabsorção de fluidos, os espermatozoides seguem para o corpo do epidídimo.

Logo após os espermatozoides deixarem a cabeça e entrarem no corpo do epidídimo ocorre o início da migração da gota citoplasmática, a aquisição da habilidade de se ligarem à zona pelúcida do ovócito, a ativação da cascata de fosforilação da proteína tirosina induzida pelo AMPc, sendo um dos fatores responsáveis por desencadear movimentos vibratórios (Knobil e Neill, 2006; Cornwall, 2009; Dacheux e Dacheux, 2014; Gervasi e Visconti, 2017). No corpo do epidídimo também é descrito uma importante alteração nuclear, a condensação final da cromatina. Os mecanismos que atuam na condensação da cromatina envolvem a reticulação das protaminas em decorrência da formação de pontes dissulfeto e diminuição da água remanescente do processo de espermatogênese, aumentando ainda mais a compactação da cromatina (Golan *et al.*, 1996; Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000).

Finalmente, a cauda do epidídimo atua como um reservatório, garantindo a manutenção da viabilidade espermática e o armazenamento de espermatozoides viáveis e aptos à fecundação, para serem liberados no momento da ejaculação, ou gradualmente fagocitados na ausência da ejaculação (Barth e Oko, 1989; Knobil e Neill, 2006).

Grande parte das alterações que o gameta masculino sofre durante o trânsito no epidídimo está relacionada com as mudanças no perfil proteômico dos espermatozoides durante a maturação. Considerando que o genoma do espermatozoide seja transcricionalmente inativo, acredita-se que as alterações observadas no perfil de proteínas durante a maturação sejam originadas da incorporação de novas proteínas de origem epididimária ou de transformações pós-traducionais das proteínas já existentes, como a fosforilação e oxidação, destacando-se no ambiente epididimário as proteínas tiol (Bedford e Calvin, 1974; Dias *et al.*, 2014; Ijiri *et al.*, 2014).

A maioria das proteínas espermáticas que são alvo de modificações durante o trânsito no epidídimo pertencem ao grupo tiol e estão localizadas na região do flagelo. Proteínas tiol são ricas em cisteína, e através de reações oxidativas entre dois resíduos de cisteína, uma ponte de dissulfeto é formada, resultando em proteínas com ligações de aminoácidos altamente estáveis

e rígidas, comumente relacionadas às funções estruturais do espermatozoide (Calvin e Bedford, 1971; Bedford e Calvin, 1974; Dias *et al.*, 2014).

Desta forma, tem sido descrito que através da oxidação de proteínas tiol, as ligações de dissulfeto são reduzidas (Calvin e Bedford, 1971; Bedford e Calvin, 1974), gerando uma estabilização gradual de regiões da célula espermática ricas em proteínas tiol, como a região do flagelo, resultando na motilidade espermática (Dias *et al.*, 2014; Gervasi e Visconti, 2017).

Corroborando com esses estudos a respeito das proteínas tiol, Shalgi e colaboradores (1989) relataram que conforme os espermatozoides de ratos transitavam pelo epidídimo, a oxidação gradual dos grupos tiol foi observada, de acordo com o surgimento da motilidade. Em garanhões, a diminuição gradual das ligações de dissulfeto em proteínas espermáticas relacionadas com a estrutura do flagelo, como a ODF-1 (*outer dense fiber-1 protein*), durante o trânsito no epidídimo, também foram descritas através da técnica de eletroforese em gel bidimensional (Dias *et al.*, 2014).

Além da alteração no perfil das proteínas já presentes nas células espermáticas antes de entrarem no epidídimo, também pode-se citar a incorporação de novas proteínas originárias do epitélio epididimário, que se aderem a membrana espermática através do contato direto do espermatozoide com o epitélio, ou através do trânsito de epididimossomos (Gervasi e Visconti, 2017).

Epididimossomos também são conhecidos como vesículas extracelulares ou exossomas. Essas pequenas estruturas nada mais são do que pequenas vesículas membranosas (25 a 300 nm de diâmetro), liberadas das células que compõem o epitélio do epidídimo e que podem carregar em seu interior diferentes moléculas como aminoácidos, proteínas, lipídios e pequenos RNAs (Gervasi e Visconti, 2017; Barcelo *et al.*, 2018; Silveira *et al.*, 2018).

Além dos epididimossomos, estudos realizados por Paunescu *et al.* (2014) mostram através de imagens de alta resolução, que existem alguns pontos específicos e bem estreitos onde os espermatozoides se conectam diretamente com a superfície epitelial apical do epidídimo, permitindo assim que algumas proteínas também sejam transferidas diretamente para o espermatozoide.

Embora algumas hipóteses sejam apontadas e comprovadas, todos os mecanismos de transferência de moléculas do epidídimo para os espermatozoides não são completamente elucidados, no entanto, diferentes métodos investigativos têm sido usados com o intuito de caracterizar o perfil de proteínas secretadas por diferentes regiões do epidídimo.

O estudo da proteômica de espermatozoides recuperados de diferentes regiões do epidídimo fornece informações para o entendimento do processo de maturação espermática, no entanto, na maioria dos casos, esses estudos foram limitados devido à falta de modelos *in vitro* que permitam a correta correlação de determinadas proteínas com a função espermática.

Algumas proteínas já foram identificadas por terem papel específico em importantes funções espermáticas como a motilidade (Eickhoff *et al.*, 2001; Frenette *et al.*, 2003; Eickhoff *et al.*, 2004; Frenette *et al.*, 2004; Murta *et al.*, 2016), a capacitação espermática, reação acrossomal, interação entre espermatozoide-zona pelúcida e fecundação (Frenette *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005; Caballero *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2013).

Além de proteínas, estão presentes no fluido epididimário alguns compostos como glicoproteínas, enzimas pertencentes ao grupo das glicosidases (β -D-galactosidases, β -N-acetil glucosaminidase, α -fucosidase, α -glucosidase e α -manosidase) e aminoácidos como a carnitina, um agente delipidante. Esses componentes estão envolvidos nos mecanismos como a formação do conteúdo acrossomal, migração da gota citoplasmática e capacidade de a célula espermática reconhecer de sítios específicos sobre a superfície dos ovócitos no momento da fecundação (Tulsiani *et al.*, 1993; Dacheux *et al.*, 2003).

Durante o trânsito epididimário algumas proteínas adquiridas são identificadas como marcadores de células defeituosas, como por exemplo a ubiquitina (Sutovsky *et al.*, 2001) e a ELSPBP1, a Proteína Epididimária de Ligação Espermática 1 (D'amours *et al.*, 2012) que são ligadas apenas a espermatozoides defeituosos ou que morrem durante o trânsito pelo epidídimo.

Estudos apontam que além do transporte contendo novas moléculas como lipídios, os epididimossomas também podem estar atuando na remoção de proteínas. A presença da proteína Dicarbonil Lxylulose Redutase (DCXR) é maior nos epididimossomas presentes na cauda do epidídimo quando comparada à porção inicial do epidídimo, e é menor nos

espermatozoides presentes na cauda do que em espermatozoides presentes na cabeça, sugerindo que de alguma maneira, essa proteína é externalizada dos espermatozoides e absorvida pelos epididimossomas durante a maturação (Akintayo *et al.*, 2015).

Por fim, abordagens recentes identificaram que epididimossomas também estão envolvidos no transporte de pequenos RNAs aos espermatozoides de mamíferos durante a maturação espermática (Sharma *et al.*, 2015). Esses pequenos RNAs, conhecidos como microRNAs podem se ligar a regiões específicas de RNAs mensageiros atuando como silenciadores pós-transcricionais (Godia *et al.*, 2018), podendo modular a expressão gênica do gameta e interferir na ativação do genoma embrionário (Sharma *et al.*, 2015; Godia *et al.*, 2018).

Plasma Seminal e Espermatozoides: Formação do sêmen

No momento da ejaculação, o plasma seminal entra em contato com os espermatozoides, proporcionando um ambiente nutritivo e protetor para a célula se manter viável no trato reprodutivo da fêmea até o momento da ovulação.

Embora a composição do plasma seminal não seja completamente descrita, principalmente devido à alta variabilidade entre indivíduos, sabe-se que o plasma seminal contém várias substâncias como ácido cítrico, glicoproteínas, proteínas e açúcares como a frutose. O plasma seminal é produzido pelas glândulas sexuais, principalmente pelas vesículas seminais (Juyena e Stelletta, 2012).

Dentre as moléculas presentes no plasma seminal, as proteínas exercem importante função nos espermatozoides, pois participam na formação dos reservatórios espermáticos, capacitação e ligação dos espermatozoides à zona pelúcida do ovócito. Dentre estas proteínas, a família composta pelas *Binder Sperm Proteins* (BSPs) merece destaque e corresponde a mais de 70% das proteínas totais do plasma seminal (Ignatz *et al.*, 2007), sendo três BSPs identificadas como principais: BSP-A1, BSP-A3 e a BSP-A5 (Ignatz *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2006).

As BSPs, especificamente a BSP-A3, atuam na formação do reservatório de espermatozoides agindo como receptores ligantes da membrana plasmática a açúcares, como a fucose e manose, presentes na região apical das células epiteliais da tuba uterina (Ignatz *et al.*, 2001; Ignatz *et al.*, 2007; Kadirvel *et al.*, 2012). Além do reservatório, as BSPs também possuem

relação com a capacitação espermática, sendo receptores que promovem a interação da heparina com a membrana plasmática (Desnoyers e Manjunath, 1992).

Reservatório da tuba uterina

A formação do reservatório ocorre especificamente na região do istmo, sendo um mecanismo presente no processo de fecundação, descrito em várias espécies de mamíferos. O reservatório de espermatozoides possui funções como a regulação da seleção de espermatozoides viáveis, manutenção da viabilidade espermática e prevenção da polispermia (Ignatz *et al.*, 2001; Gualtieri *et al.*, 2010).

A ligação dos espermatozoides às células da tuba uterina está relacionada com a presença de proteínas presentes na membrana plasmática do espermatozoide e açúcares presentes nas células da tuba uterina (Fazeli *et al.*, 1999; Ignatz *et al.*, 2001). Como anteriormente mencionado, em bovinos os principais açúcares presentes nas células da tuba uterina que atuam como receptores ligantes são a fucose, manose, ou um glicano conhecido como o SuleA (Ignatz *et al.*, 2001; Ignatz *et al.*, 2007; Kadirvel *et al.*, 2012). Além da fucose, manose e SuleA, anexinas também são apontadas como receptores presentes no epitélio da tuba (Gualtieri *et al.*, 2010).

Após a formação dos reservatórios, os espermatozoides permanecem ligados até que ocorra a ovulação, quando se desprendem gradativamente e seguem para a região da ampola. O mecanismo exato que faz com que os espermatozoides se desliguem do reservatório no momento da ovulação, ainda são desconhecidos. De fato, estudos que relacionam fatores bioquímicos, biofísicos e quimiotáticos já foram descritos por diversos grupos de pesquisa (Gualtieri *et al.*, 2010; Gualtieri *et al.*, 2012; Gualtieri *et al.*, 2013; Tung *et al.*, 2014). Alguns dos possíveis desencadeantes desse complexo processo são apontados como fatores secretados pelo trato reprodutivo da fêmea, como por exemplo, heparina e penicilamina, descritos por Gualtieri *et al.* (2013), bem como a progesterona, prostaglandinas (Hunter e Rodriguez-Martinez, 2004) e sinalizações ovocitárias (Elsokary e Miller, 2017).

Capacitação Espermática

O processo de capacitação é definido por um conjunto de alterações fisiológicas que se iniciam durante o desligamento dos espermatozoides do reservatório da tuba uterina (Fazeli *et al.*, 1999), ou *in vitro*, através da incubação dos espermatozoides em meios específicos (Parrish *et al.*, 1986; Parrish *et al.*, 1988; Parrish *et al.*, 1989). Em bovinos, a heparina, o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), a albumina e o Ca_2^+ , presentes no trato reprodutivo da fêmea, atuam no processo de capacitação espermática (Miller *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1992; Thérien *et al.*, 1998; Flesch *et al.*, 2001).

As mudanças descritas durante a capacitação em bovinos são induzidas pela ligação da heparina às BSPs, que se encontram ancoradas aos fosfolipídios que compõem a membrana plasmática (Desnoyers e Manjunath, 1992). Desta forma, a ligação da heparina às BSPs em conjunto com os altos níveis de albumina e NaHCO_3 , presentes no trato reprodutivo da fêmea, promovem o efluxo do colesterol, causando uma desorganização estrutural da membrana plasmática e conseqüentemente alterando sua fluidez e aumentando o pH intracelular (Miller *et al.*, 1990; Flesch e Gadella, 2000; Parrish, 2014; Kuo *et al.*, 2016).

Durante a capacitação espermática, a albumina atua sempre em conjunto com o NaHCO_3 , agindo como um aceptor, captando o colesterol removido e evitando que ele retorne para a membrana (Leahy e Gadella, 2015; Kuo *et al.*, 2016).

Recentemente, pequenos canais localizados na região flagelar dos espermatozoides, têm sido descritos como o principal responsável pelo transporte de íons de Ca_2^+ para dentro da célula, esses canais são conhecidos como CatSper e já foram identificados em suínos, humanos, murinos e ovinos (Singh e Rajender, 2015; Vicente-Carrillo *et al.*, 2016).

Devido ao aumento da concentração intracelular de Ca_2^+ e NaHCO_3 , ocorre também o aumento do pH intracelular e com isso a ativação de um tipo único de adenilciclase presente no espermatozoide, a adenilciclase solúvel (SACY). A principal característica do SACY é ser ativada por Ca_2^+ e NaHCO_3 , e não pela proteína G ou pela forskolina, assim como a maioria das adenilciclases (Gadella e Harrison, 2000). Após a ativação, a enzima adenilciclase-SACY irá atuar na conversão de ATP em AMPc. Com o aumento dos níveis de AMPc ocorre a ativação da proteína Kinase A (PKAs), AMPc dependente, induzindo a fosforilação da proteína tirosina

(Signorelli *et al.*, 2012; Parrish, 2014) e desencadeando a hipermotilidade, característica de um espermatozoide capacitado (Mortimer *et al.*, 1998).

Tem sido descrito que os mecanismos envolvidos durante o processo de capacitação diferem entre os espermatozoides do ejaculado e do epidídimo (Matás *et al.*, 2010). Tais observações podem estar relacionadas às mudanças estruturais que a membrana plasmática sofre durante a maturação epididimária e a ejaculação. Além das funções anteriormente mencionadas, o plasma seminal atua como uma película protetora para o espermatozoide sobreviver ao ambiente do trato reprodutor feminino. Muitas proteínas do plasma seminal servem como fatores decapacitantes, sendo que, durante o processo de capacitação espermática, essas proteínas são removidas da superfície dos espermatozoides (Juyena e Stelletta, 2012). De fato, resultados obtidos por Matás e colaboradores (2010) indicaram que espermatozoides epididimários se capacitam mais rápido que espermatozoides do ejaculado. O que pode ser atribuído ao fato de que espermatozoides que entram em contato com o plasma seminal recebem os fatores decapacitantes que se aderem à sua membrana, retardando o processo de capacitação (Juyena e Stelletta, 2012).

Avaliações da viabilidade espermática

Análise de rotina do sêmen criopreservado consiste na avaliação subjetiva de motilidade, proporção de espermatozoides com morfologia normal e concentração de espermatozoides por dose. Porém, para estimar de forma mais acurada a fertilidade de uma amostra é necessário avaliar eventos fisiológicos tais como a capacitação e a reação acrossomal, que são importantes no processo de fecundação. Portanto, amostras de sêmen que apresentam características de motilidade e morfologia normais nem sempre atingem taxas aceitáveis de fecundação, pois os espermatozoides podem ter algum problema estrutural ou funcional que possam prejudicar a sua capacidade fecundante (Celeghini *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2011; Standerholen *et al.*, 2014; Sapanidou *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2015).

Sendo assim, outras técnicas *in vitro* que avaliem outros aspectos das células espermáticas tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores (Celeghini *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2011; Standerholen *et al.*, 2014; Sapanidou *et al.*, 2015). Embora nenhuma técnica de avaliação, apresente, isoladamente, sensibilidade suficiente para a estimar a fertilidade, a

combinação de diversos métodos permite uma estimativa mais acurada do potencial de fecundação das amostras de sêmen.

Quanto à avaliação da motilidade, o sistema de análise computadorizada do movimento espermático - “*computer-assisted semen analysis*” (CASA) tem sido o mais utilizado. Este tipo de análise permite uma avaliação mais exata e objetiva da motilidade, fornecendo informações precisas e significativas da cinética da célula espermática (Mortimer *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2006). Ou seja, determina não somente a percentagem de células móveis como também quantifica características específicas do movimento espermático (Garner *et al.*, 1997).

Além da avaliação da motilidade, avaliação da funcionalidade da célula através da marcação de compartimentos/organelas específicos, ou o metabolismo celular também são ferramentas importantes. Dentre as várias técnicas disponíveis para esses ensaios laboratoriais, o emprego de corantes fluorescentes associados à microscopia de fluorescência permite avaliações de organelas ou compartimentos, associadas ou não a outros eventos como o transporte de íons e metabolismo celular, ou a localização de proteínas (Combs, 2010).

Dentro da microscopia de fluorescência pode ser destacado o uso da citometria de fluxo, que permite análises de vários parâmetros em uma única célula, de forma simultânea, rápida e objetiva. Além disso, permite a avaliação de milhares de células em análises que associem mais de uma característica em uma mesma amostra. O equipamento mais sofisticado que pode ser destacado são citômetros de fluxo que possuem uma câmera acoplada ao sistema, onde softwares específicos permitem além de gráficos a aquisição de imagens instantâneas. Esses citômetros são conhecidos como *flow cytometry image*.

A avaliação da integridade de membrana pode ser feita com o uso de sondas fluorescentes para DNA, tais como o corante vital Hoechst 33342 (H33342), Hoechst 33258 (Hoechst 33342), SYBR-14 e o Iodeto de Propídeo (IP). As sondas Hoechst 33342 e Hoechst 33258 se ligam ao DNA, possuindo especificidade às regiões das bases nitrogenadas da adenina e timina (Garner *et al.*, 1997; Gillan *et al.*, 2005; Hallap *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2015), marcando de azul o núcleo de todas células (H33342) ou apenas de células lesionadas (H33258). O IP e o SYBR-14 são fluorocromos com afinidade à cromatina, que penetram no núcleo de células com a

membrana lesionada e de células com a membrana íntegra, respectivamente, emitindo assim uma coloração estável (Harrison *et al.*, 1992; Gillan *et al.*, 2005; Celeghini *et al.*, 2007).

No que se refere a avaliação da capacitação espermática, atualmente dois métodos são utilizados: a sonda fluorescente lipofílica Merocianina 540 e o hidróclorido de clortetraciclina (CTC). A Merocianina 540 atua como um marcador do nível de desordem dos fosfolipídios da bicamada lipídica da membrana plasmática, tendo afinidade especificamente com fosfatidilcolina presente na membrana. A desordem então seria um indicativo de membrana desestabilizada, aumentando a emissão da intensidade de fluorescência ao ligar-se à fosfatidilcolina (Fernandez-Santos *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2009). O CTC é uma molécula não fluorescente que atua como um quelante do Ca^{2+} , ao ser excitado pelo microscópio de epifluorescência permite a visualização identificando a presença e localização de Ca^{2+} na célula espermática (Fraser *et al.*, 1995).

Para avaliação da condição acrossomal várias técnicas estão disponíveis. O conteúdo ácido presente na vesícula acrossomal, quando intacta, possibilita a utilização de sondas acidofílicas como *LysoTracker Green* DND-26 (LYSO-G) ou anticorpos anti-acrosina e anticorpos anti-hialuronidase. Outro meio de mensurar a integridade acrossomal é através do uso de lectinas conjugadas, devido ao seu ambiente glicoproteico. As lectinas conjugadas se ligam a glucose, manose, galactose e N-acetilglucosamina ou outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma, revisado por Cunha *et al.* (2015).

Dependendo da espécie, as lectinas comumente utilizadas são *Pisum sativum* (Green pea; PSA) ou *Arachis hypogaea* (peanut; PNA). Para visualização em microscopia de fluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tal como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Baker *et al.*, 2004; Silva e Gadella, 2006).

Outro evento fisiológico que pode ser avaliado nas células espermáticas é a apoptose, ou morte celular programada. No início do processo de apoptose a membrana plasmática torna-se ligeiramente permeável, perdendo a organização dos fosfolipídios e fazendo com que a fosfatidilserina, um fosfolipídio presente apenas na face interna da membrana, seja translocada para a face externa da membrana plasmática. Este sinal inicial de apoptose pode ser

identificado pela ligação da anexina V, cálcio-dependente, à fosfatidilserina externalizada, presente apenas em células que iniciaram o processo de apoptose. A anexina V é uma proteína não fluorescente, mas que ao ser conjugada ao FITC pode ser visualizada em epifluorescência, detectando assim a apoptose (Chaveiro *et al.*, 2007; Pena, 2007).

Dentre as avaliações *in vitro* disponíveis para a predição da fertilidade de amostras de sêmen, além das avaliações mencionadas, o exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de qualidade do sêmen, representando uma etapa crucial no exame andrológico. Para esta avaliação podem ser utilizados esfregaços corados com vermelho congo, rosa bengala, ou através da preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou interferência diferencial (CBRA, 2013).

O contraste de fase representa uma ótima ferramenta quando se trata de avaliações que buscam a identificação de defeitos morfológicos, no entanto, quando o objetivo da análise morfológica envolve a identificação de componentes menores ou a caracterização celular, ferramentas ainda mais precisas como a microscopia de força atômica (MFA) podem ser utilizadas (Ierardi *et al.*, 2008; Whited e Park, 2014).

Ierardi e colaboradores (2008) ao estudar espermatozoides de coelhos, mostraram que os detalhes mais precisos da estrutura dos espermatozoides são imperceptíveis às avaliações através de microscopia óptica, que utiliza métodos manuais para identificação e mensuração de estruturas, pois estes oferecem resolução limitada. Como alternativa, a MFA tem se tornado uma ferramenta multidisciplinar inestimável para a caracterização avançada de diferentes materiais. Em sua aplicação básica, fornece imagens com alta resolução de estruturas superficiais em escalas que variam de nanômetros a micrômetros (Silva, 2005; Whited e Park, 2014).

Para a análise específica de espermatozoides, a MFA já foi utilizada em estudos de caracterização (Ierardi *et al.*, 2008), organização da membrana de plasmática (Jones *et al.*, 2007; Whited e Park, 2014) investigação de defeitos morfológicos (Saeki *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018), interação de componentes extracelulares com proteínas de membrana (Barboza *et al.*, 2004; Whited e Park, 2014) e comparação entre o tamanho e forma de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y (Carvalho *et al.*, 2013).

Diferentes técnicas podem ser empregadas em análises na MFA. Para a célula espermática pode-se destacar o modo contato, onde uma pequena ponteira geralmente em formato piramidal, encontra-se na extremidade de um *cantilever* altamente flexível. Desta maneira, em conjunto com um laser, a ponteira permanece em contato direto com a superfície do material avaliado, permitindo o monitoramento das deflexões presentes na superfície da amostra, através de uma varredura altamente discriminadora das direções X e Y, mantendo sempre fixo o eixo Z. A partir deste mecanismo, a MFA gera resultados com resolução atômica, que permitem o estudo da morfologia de materiais biológicos ou não (revisado por Silva 2005; Whited e Park, 2014).

De uma maneira geral, as avaliações espermáticas são necessárias após eventos que causem injúrias ao espermatozoide, como por exemplo o processo de criopreservação e sexagem, bem como a identificação de animais subférteis ou animais que apresentem alguma alteração em seu estado reprodutivo.

Fecundação

Nos mamíferos, a fecundação ocorre após a interação do espermatozoide com o ovócito, iniciando a formação de um novo indivíduo. O processo de fecundação envolve várias etapas, em síntese, a fecundação pode ser descrita em: ligação à zona pelúcida; contato e reconhecimento entre os gametas; passagem do espermatozoide pela zona pelúcida; incorporação do espermatozoide no citoplasma do ovócito; ativação do ovócito, descondensação da cabeça; formação de pró-núcleos, singamia e início do desenvolvimento embrionário (Gilbert, 2003; Evans, 2012).

É descrito que a capacitação espermática ocorre logo após os espermatozoides se desligarem do reservatório da tuba uterina (Ignatz et al., 2001; Rodriguez-Martinez, 2007). Em seguida, para que o espermatozoide passe pelas células do cumulus expandidas que circundam o ovócito, uma hialuronidase espermática é ativada, a PH-20 (Lin et al., 1994). Além da PH-20, a proteína denominada Hya15, com atividade hialuronidase, também atua facilitando a passagem do espermatozoide pelas células do cumulus, ambas agem na digestão da matriz de ácido hialurônico. Desta forma, o espermatozoide passa a barreira formada pelas células do cumulus sem lesionar seu acrossoma (Kim et al., 2005). Somente após a capacitação, com o auxílio da

hipermotilidade, o espermatozoide é capaz de passar pelas camadas de células do cumulus e se ligar a zona pelúcida do ovócito (Mortimer et al., 1998; Flesch e Gadella, 2000; Kanai et al., 2007).

Após ultrapassar a barreira formada pelas células do cumulus, o espermatozoide capacitado se liga à zona pelúcida, composta por uma série de glicoproteínas (Kanai et al., 2007), que nos mamíferos são ZP1, ZP2 e ZP3. Sua atividade reside em uma classe de serina/treonina, ligados a cadeias de oligossacarídeos, o que permite que receptores presentes na superfície espermática desencadeiem a reação acrossomal, requisito indispensável para a fecundação (Kanai et al., 2007; Litscher et al., 2009).

A reação acrossomal modifica a permeabilidade da membrana espermática devido a formação dos poros na região acrossomal, modificando assim a morfologia e algumas proteínas presentes no segmento equatorial do gameta masculino (Litscher et al., 2009; Parrish, 2014).

Os espermatozoides passam pela zona pelúcida e chegam ao espaço perivitelino do ovócito, onde ocorre a fusão da membrana plasmática do espermatozoide, especificamente através da região do segmento equatorial espermático, com o oolema (Kupker et al., 1998). No espermatozoide, proteínas como a β 1,4-galactosiltransferase (GalTase), a fertilina e as ADAM1 e ADAM2, têm sido associadas com o reconhecimento das membranas espermática e ovocitária (Evans, 2012). Já no gameta feminino, o reconhecimento está associado à família de proteínas GPI em conjunto com as proteínas Cd9 integrina (Lu e Shur, 1997; Evans, 2012). Ainda sobre as sinalizações que envolvem as proteínas, a proteína de membrana espermática expressa após a reação acrossomal, a IZUMO1, e seu receptor homólogo ovocitário JUNO6, foram identificados como uma “proteína-chave”, essencial para a incorporação do espermatozoide no ovócito (Ohto et al., 2016).

Após a fusão dos gametas, os ovócitos dos mamíferos são ativados. A ativação do ovócito inclui a conclusão da meiose com a extrusão do segundo corpúsculo polar, estabelecimento do bloqueio de polispermia, desenvolvimento dos pró-núcleos, início da mitose e o recrutamento seletivo RNA mensageiro materno (Duncan et al., 2016).

A ativação ovocitária é iniciada pela liberação de uma fosfolipase espermática, a fosfolipase C Zeta, que desencadeia oscilações intracelulares de cálcio no ovócito (Fujimoto et

al., 2004; Xu e Yang, 2017). Além do cálcio, também tem sido relatado que a liberação coordenada de zinco, o *zinc spark*, no espaço extracelular é um elemento essencial para a ativação do gameta feminino, atuando principalmente na retomada da meiose e transição para a mitose (Duncan et al., 2016).

Em resposta ao aumento de cálcio, a reação cortical ovocitária é ativada. O conteúdo liberado pelos grânulos corticais, a enzima N-acetil glicosaminidase, resulta na clivagem proteolítica da ZP3, promovendo também a clivagem da ZP2. Esse mecanismo gera o enrijecimento da zona pelúcida, de maneira que os espermatozoides não tenham mais capacidade de se ligar, resultando assim no mecanismo de bloqueio à polispermia (Visconti e Florman, 2010).

Após o espermatozoide entrar no ooplasma, o envelope nuclear do espermatozoide se desfaz, aumentando de forma considerável, mecanismo conhecido como descondensação da cabeça (Payne et al., 1997; Kupker et al., 1998). Com a degradação do envelope nuclear, ocorre a redução de ligações de dissulfeto entre as protaminas, que são degradadas e substituídas por histonas ovocitárias (Kupker et al., 1998). Aproximadamente uma hora após a descondensação da cabeça do espermatozoide ocorre a formação do pró-núcleo masculino e, simultaneamente, ocorre a descondensação da cromatina materna e formação do pró-núcleo feminino (Payne et al., 1997). Os pró-núcleos feminino e masculino se aproximam, desintegram as membranas e o alinhamento dos cromossomos é direcionado pelos microtúbulos formados pelos centrosomos do primeiro fuso de clivagem. Isso marca o fim do processo de fecundação, a retomada da mitose e o início do desenvolvimento embrionário (Payne et al., 1997; Kupker et al., 1998).

Uso de espermatozoides do epidídimo na produção in vitro de embriões

O uso de EP na PIVE e sua relação com a taxa de embriões produzidos começaram a ser realizados há pouco mais de uma década. Esses estudos tiveram como objetivo a determinação do melhor método de recuperação de EP, incluindo o tempo de recuperação post-mortem, o tempo de viabilidade quando mantidos em temperatura de resfriamento, ou o armazenamento a temperatura ambiente (Martinez-Pastor *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009; Bertol *et al.*, 2016). No que se refere a produção de embriões utilizando EP, os resultados são variáveis, sendo que alguns estudos mostram taxa de produção semelhante ao do EJ (Martins *et al.*, 2007; Stout,

2012; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016) enquanto em outro (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016) a taxa de embriões é menor do que o EJ. Na maioria destes estudos, nenhuma alteração no protocolo foi proposta, sendo utilizados os protocolos para EJ.

Para a PIVE, com o objetivo de obter uma população espermática de melhor qualidade, inicialmente os espermatozoides são preparados através da seleção espermática. A preparação de espermatozoides refere-se ao uso de procedimentos que selecionem uma população de células viáveis e com melhor padrão de motilidade. Dentre esses procedimentos podem ser citados o método swim-up e a centrifugação em gradiente de densidade.

O swim-up é um método mais antigo, simples e econômico utilizado para a separar espermatozoides móveis do plasma seminal, diluidor e de restos celulares indesejados durante o processo da PIVE (Arias *et al.*, 2017). A técnica swim-up consiste em homogeneizar o sêmen em meio SpTALP (Lactato e Piruvato de Albumina Tyrode), mantendo-o incubado à temperatura de 38 °C, em um tubo inclinado de maneira que se forme um ângulo de 45°C. Desta forma, através da motilidade ascendente, os espermatozoides móveis migram para a região sobrenadante do tubo enquanto os demais constituintes permanecem na porção inferior (Parrish *et al.*, 1995; Arias *et al.*, 2017). A técnica resulta em alta porcentagem de espermatozoides móveis e com morfologia normal, no entanto, a concentração de espermatozoides separados é baixa e a literatura descreve que o swim-up pode ser prejudicial aos espermatozoides, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos durante o período necessário para a migração dos espermatozoides até região superior do tubo (Arias *et al.*, 2017).

Parrish *et al.* (1995) desenvolveram o procedimento de centrifugação com o uso do gradiente de Percoll que em 2009 foi otimizado, onde foi possível reduzir o volume de Percoll e o tempo de centrifugação (Machado *et al.*, 2009). O Percoll é composto por partículas de sílica coloidal (15-30nm de diâmetro) revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) não dialisáveis (De Vos *et al.*, 1997). Essas partículas podem se ligar aos espermatozoides, e caso esses não sejam bem lavados após o procedimento de centrifugação, elas podem ter efeitos endotóxicos.

Apesar do Percoll ser o gradiente mais utilizado comercialmente na área animal, o seu efeito tóxico já foi relatado em humanos, resultando em aumento na porcentagem de embriões

fragmentados e menores taxas de gestação (De Vos *et al.*, 1997). Além do efeito tóxico, relatos que descrevem a falta de padronização na sua composição, diferindo entre lotes, estão relacionados com diminuição das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário (Mendes *et al.*, 2003). Devido a esses problemas, o uso do Percoll foi proibido na reprodução assistida humana e as empresas farmacêuticas buscaram outros métodos livres de PVP em sua composição (De Vos *et al.*, 1997; Mccann e Chantler, 2000; Mendes *et al.*, 2003).

O uso de gradientes como PureSperm, BoviPure e Isolate, compostos de partículas de sílica coloidal revestidas com silano, e também o OptiPrep, composto por partículas revestidas com iodaxanol, são opções para a substituição do Percoll na PIVE de bovinos (Mendes *et al.*, 2003; Samardzija *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2014; Bertol *et al.*, 2016). Apesar do BoviPure ter sido formulado especificamente para uso com espermatozoides de touros, poucos estudos foram realizados para avaliar o seu uso nessa espécie. Já a comparação de OptiPrep e Isolate na PIV de bovinos mostrou que o grupo em que o Isolate foi utilizado resultou em maiores taxas de blastocistos no sétimo e oitavo dia de cultivo (Vianna *et al.*, 2014).

Estudos utilizando EP já relataram o uso do gradiente Percoll (Martins *et al.*, 2007; Stout, 2012; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016), BoviPure (Bertol *et al.*, 2016) e a simples lavagem por centrifugação em meio TALP (Chaveiro *et al.*, 2015). Esses autores compararam a produção de embriões entre EP e EJ, e os resultados obtidos foram variados e sem correlação com o método de seleção utilizado. Desta forma, nenhum estudo comparou diferentes protocolos de preparo de EP para a PIVE, não sendo descrito até o momento se o método ideal para seleção de EP seria o mesmo utilizado para EJ.

Após a seleção dos espermatozoides esses são co-incubados com os ovócitos maturados em um meio de cultivo onde a heparina é adicionada como indutor da capacitação espermática. A heparina, como mencionado anteriormente, induz a capacitação do espermatozoide bovino por se ligar às BSPs e promover o efluxo de colesterol. Apesar do uso da heparina já estar bem estabelecido para espermatozoides do ejaculado (Mendes *et al.*, 2003; Stout, 2012; Parrish, 2014), a necessidade de se utilizar a heparina para o EP não está claro, uma vez que as BSPs não estão presentes na membrana espermática nesse tipo de espermatozoide (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016).

Stout (2012) avaliou a viabilidade e longevidade de EP através da incubação em meio de fecundação suplementado com 5, 10 e 20ug/mL de heparina. Os EP foram avaliados após 2h, 4h e 6h pós-descongelamento. Os resultados desse estudo mostraram que a presença da heparina e/ou a concentração não afetaram a capacitação, integridade de membrana plasmática ou reação acrossomal dos espermatozoides. Esse mesmo autor avaliou a produção de blastocistos utilizando EP incubado em meio de fecundação suplementado ou não com 10ug/mL de heparina, os resultados mostraram que na presença da heparina a produção de blastocistos foi similar para EP ou EJ, sendo também similar ao grupo EP na ausência da heparina. Já Rodriguez-Villamil *et al.* (2016) não observaram diferenças na produção de embriões quando o EP foi exposto ou não a heparina durante a PIVE.

Além do método de seleção espermática e composição do meio de fecundação, outro fator a ser considerado que pode afetar o sucesso da FIV é o tempo de co-incubação de espermatozoides e ovócitos. Dode *et al.* (2002) avaliaram a taxa de fecundação quando espermatozoides e ovócitos foram co-incubados por diferentes períodos (3h, 6h, 12 e 18h) e observaram que os EJ precisam estar em contato com ovócitos por no mínimo 12 horas, podendo se estender até 18 horas. Já com EP todos os relatos descrevem como tempo de co-incubação utilizado 18 ± 2 h, conforme estabelecido para os EJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINTAYO, A.; LEGARE, C.; SULLIVAN, R. Dicarbonyl L-xylulose reductase (DCXR), a "moonlighting protein" in the bovine epididymis. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0120869, 2015.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 3. New York: Garland, 1994. 1600.

ARIAS, M. E.; ANDARA, K.; BRIONES, E.; FELMER, R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. **Reproductive biology**, n. 226, p. 7, 2017.

BAKER, S. S.; THOMAS, M.; THALER, C. D. Sperm Membrane Dynamics Assessed by Changes in Lectin Fluorescence Before and After Capacitation. **Journal of andrology**, v. 25, n. 5, 2004.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. 227, 2007.

BARBOZA, J. M.; MEDINA, H.; DORIA, M.; RIVERO, L.; HERNANDEZ, L.; JOSH, N. V. Use of atomic force microscopy to reveal sperm ultrastructure in HIV patients on highly active antiretroviral therapy. **Archives of andrology**, v. 50, p. 121-129, 2004.

BARCELO, M.; MATA, A.; BASSAS, L.; LARRIBA, S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. **Human reproduction**, v. 33, n. 6, p. 1087-1098, 2018.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa: Iowa State University: Ed. Ames, 1989. 285.

BEDFORD, J. M.; CALVIN, H. I. Changes in -S-S- Linked Structures of the Sperm Tail during Epididymal Maturation, with Comparative Observations in Sub-mammalian Species. **Journal of experimental zoology**, p. 181-203, 1974.

BERTOL, M. A.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; ABREU, A. C.; PEREIRA, J. F.; DA SILVA, J. J. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored

for up to 30 hours at ambient temperature (18 degrees C-20 degrees C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014-21, 2016.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; MAYOR, G. M.; ALMINANA, C.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International journal of andrology**, v. 32, n. 5, p. 505-13, 2009.

CABALLERO, J. N.; FRENETTE, G.; BELLEANNEE, C.; SULLIVAN, R. CD9-positive microvesicles mediate the transfer of molecules to Bovine Spermatozoa during epididymal maturation. **Plos one**, v. 8, n. 6, p. e65364, 2013.

CALVIN, H. I.; BEDFORD, J. M. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. **Journal of reproduction and fertility**, v. 13, p. Suppl 13:65-75, 1971.

CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Nanoscale Differences in the Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed by Atomic Force Microscopy. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. e59387, 2013.

CELEGHINI, E. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-88, 2007.

CHAVEIRO, A.; CERQUEIRA, C.; SILVA, J.; FRANCO, J.; F, M. D. S. Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 2, p. 188-193, 2015.

CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; DA SILVA, F. M. Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 1, p. 17-21, 2007.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 140.

COMBS, C. A. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. **Current protocols in neuroscience** v. Chapter 2, p. Unit2 1, 2010.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-27, 2009.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; DODE, M. A. N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: ciências agrárias**, v. 36, n. 6 p. 4365, 2015.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; GUIMARAES, A. L. S.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M.; VIANA, J. H. M.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. **Plos one**, v. 14, n. 1, p. e0209692, 2019.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; KUSSANO, N. R.; MARTINS, C. F.; MOURAO, G. B.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 348-355, 2016.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27-42, 2014.

DACHEUX, J.-L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.

D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; BORDELEAU, L. J.; ALLARD, N.; LECLERC, P.; BLONDIN, P.; SULLIVAN, R. Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 4, p. 94, 2012.

DE VOS, A.; NAGY, Z. P.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; BOCKEN, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human reproduction**, v. 12, p. 1980-1984, 1997.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. J. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid **Biology chemistry**, v. 267, p. 10149-10155, 1992.

DIAS, G. M.; LÓPEZ, M. L.; FERREIRA, A. T. S.; CHAPEAUROUGE, D. A.; RODRIGUES, A.; PERALES, J.; RETAMAL, C. A. Thiol-disulfide proteins of stallion epididymal spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1-2, p. 29-39, 2014.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENOA, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes **Animal reproduction science**, v. 69, p. 15-23, 2002.

DUNCAN, F. E.; QUE, E. L.; ZHANG, N.; FEINBERG, E. C.; O'HALLORAN, T. V.; WOODRUFF, T. K. The zinc spark is an inorganic signature of human egg activation. **Scientific reports**, v. 6, p. 24737, 2016.

EICKHOFF, R.; BALDAUF, C.; KOYRO, H. W.; WENNEMUTH, G.; SUGA, Y.; SEITZ, J.; HENKEL, R.; MEINHARDT, A. Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphhydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. **Molecular human reproduction**, v. 10, n. 8, p. 605-11, 2004.

EICKHOFF, R.; WILHELM, B.; RENNEBERG, H.; WENNEMUTH, G.; BACHER, M.; LINDER, D.; BUCALA, R.; SEITZ, J.; MEINHARDT, A. Purification and Characterization of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Secretory Protein from Rat Epididymis: Evidences for Alternative Release and Transfer to Spermatozoa. **Molecular medicine**, v. 7, n. 1, p. 27-35, 2001.

ELSOKARY, M. M.; MILLER, D. J. Mature oocytes trigger the release of bovine sperm from an immobilized oviduct glycan. **Reproduction, fertility and development**, v. 29, n. 1, p. 193-193, 2017.

EVANS, J. P. Sperm-egg interaction. **Annual review of physiology**, v. 74, p. 477-502, 2012.

FAZELI, A.; DUNCAN, A. E.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Sperm-Oviduct Interaction: Induction of Capacitation and Preferential Binding of Uncapacitated Spermatozoa to Oviductal Epithelial Cells in Porcine Species. **Biology of reproduction**, v. 60, p. 879-886, 1999.

FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ESTESO, M. C.; SOLER, A. J.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; GARDE, J. J. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 738-53, 2007.

FLESCH, F. M.; BROUWERS JOS, F. H. M.; NIEVELSTEIN, P. F. E. M.; VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, M. G. L.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of cell science**, v. 114, p. 3543-3555, 2001.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRASER, L. R.; ABEYDEERA, L. R.; NIWA, K. Ca²⁺-Regulating Mechanisms That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis **Molecular reproduction and development**, v. 40, p. 233-241, 1995.

FRASER, L. R.; DRURY, L. M. Effect of removal of epididymal secretions on fertilization in vitro of mouse eggs. **Journal reproduction fertility**, v. 48, p. 125-128, 1976.

FRENETTE, G.; LEGARE, C.; SAEZ, F.; SULLIVAN, R. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. **Molecular human reproduction**, v. 11, n. 8, p. 575-82, 2005.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; MADORE, E.; FORTIER, M. A.; SULLIVAN, R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1586-92, 2003.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Molecular reproduction and development**, v. 69, n. 4, p. 448-56, 2004.

FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. Sperm chromatin. **Andrology**, v. 45, p. 215–225, 2000.

FUJIMOTO, S.; YOSHIDA, N.; FUKUI, T.; AMANAI, M.; ISOBE, T.; ITAGAKI, C.; IZUMI, T.; PERRY, A. C. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. **Developmental biology**, v. 274, n. 2, p. 370-83, 2004.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407–2420 2000.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DELARNETTE, M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 10, p. 860-874, 2016.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204-218, 2017.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445-57, 2005.

GODIA, M.; SWANSON, G.; KRAWETZ, S. A. A history of why fathers' RNA matters. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 147-159, 2018.

GOLAN, R.; SHOCHAT, L.; LEWIN, L. M.; OSCHRY, Y.; COOPER, T. G.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H. Andrology: Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. **Human reproduction**, v. 11, n. 7, p. 1457-1462, 1996.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; TALEVI, R. Bovine oviductal monolayers cultured under three-dimension conditions secrete factors able to release spermatozoa adhering to the tubal reservoir in vitro. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 429-35, 2013.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V.; TALEVI, R. Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1037-43, 2010.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BRAUN, S.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; TALEVI, R. Long-term viability and differentiation of bovine oviductal monolayers: bidimensional versus three-dimensional culture. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1456-64, 2012.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, 2006.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122-36, 2006.

HARKEMA, W.; COLENBRANDER, B.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 215-226, 2004.

HARRISON, R. A. P.; JACQUES, M. L.; PASCUAL MINGUEZ, M. L.; MILLER, N. G. A. Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. **Journal of cell science**, v. 102, 1992.

HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 3, p. 406-19, 2011.

HUNTER, R. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. **Molecular reproduction and development**, v. 67, n. 2, p. 243-50, 2004.

IERARDI, V.; NICCOLINI, A.; ALDERIGHI, M.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; SOLARO, R. AFM characterization of rabbit spermatozoa. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 7, p. 529-35, 2008.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-13, 2007.

IGNOTZ, G. G.; LO, M. C.; PEREZ, C. L.; GWATHMEY, T. M.; SUAREZ, S. S. Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma That May Be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir. **Biology of reproduction**, v. 64, p. 1806-1811, 2001.

IJIRI, T. W.; VADNAIS, M. L.; HUANG, A. P.; LIN, A. M.; LEVIN, L. R.; BUCK, J.; GERTON, G. L. Thiol changes during epididymal maturation: a link to flagellar angulation in mouse spermatozoa? **Andrology**, v. 2, n. 1, p. 65-75, 2014.

JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, A.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 438-44, 2007.

JOSHI, C. S.; SURYAWANSHI, A. R.; KHAN, S. A.; BALASINOR, N. H.; KHOLE, V. V. Liprin alpha3: a putative estrogen regulated acrosomal protein. **Histochemistry and cell biology**, v. 139, n. 4, p. 535-48, 2013.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1249-1259, 2003.

KADIRVEL, G.; MACHADO, S. A.; KORNELI, C.; COLLINS, E.; MILLER, P.; BESS, K. N.; AOKI, K.; TIEMEYER, M.; BOVIN, N.; MILLER, D. J. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 147, 2012.

KANAI, S.; YONEZAWA, N.; ISHII, Y.; TANOKURA, M.; NAKANO, M. Recombinant bovine zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4 coexpressed in Sf9 cells form a sperm-binding active hetero-complex. *The FEBS journal*, v. 274, n. 20, p. 5390-405, 2007.

KIM, E.; BABA, D.; KIMURA, M.; YAMASHITA, M.; KASHIWABARA, S.; BABA, T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 18028–18033, 2005.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. E. U. O. A. E., 2006. 3191P. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. United of America: Elsevier, 2006.

KRISHNAKUMAR, S.; WHITESIDE, D. P.; ELKIN, B.; THUNDATHIL, J. C. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology*, v. 76, n. 2, p. 252-60, 2011.

KUO, Y. W.; LI, S. H.; MAEDA, K.; GADELLA, B. M.; TSAI, P. S. Roles of the reproductive tract in modifications of the sperm membrane surface. *The journal of reproduction and development*, v. 62, n. 4, p. 337-43, 2016.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. *Human reproduction*, v. 13 Suppl 1, p. 20-32, 1998.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian journal of andrology*, v. 17, n. 4, p. 561-7, 2015.

LIN, Y.; MAHAN, K.; LATHROP, W. F.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *The Journal of cell biology*, v. 125, n. 5, p. 1157-63, 1994.

LITSCHER, E. S.; WILLIAMS, Z.; WASSARMAN, P. M. Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Molecular reproduction and development*, v. 76, n. 10, p. 933-41, 2009.

LU, Q.; SHUR, B. D. Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. **Development**, v. 124, n. 20, p. 4121-31, 1997.

MA, Y.; XIE, N.; LI, Y.; ZHANG, B.; XIE, D.; ZHANG, W.; LI, Q.; YU, H.; ZHANG, Q.; NI, Y.; XIE, X. Teratozoospermia with amorphous sperm head associate with abnormal chromatin condensation in a Chinese family. **Systems biology in reproductive medicine**, p. 1-10, 2018.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 1289-1297, 2009.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471-85, 2006.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A. R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 24-40, 2005.

MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P. M.; CARVALHO-NETO, J. O.; DE SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M. N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. **Animal reproduction science**, v. 116, n. 1-2, p. 50-7, 2009.

MARTINS, C. F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D. C.; DODE, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal reproduction science**, v. 101, n. 3-4, p. 326-31, 2007.

MATAS, C.; SANSEGUNDO, M.; RUIZ, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; ROMAR, R.; COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1327-1340, 2010.

MCCANN, C. T.; CHANTLER, E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **International journal of andrology**, v. 23, p. 205-209, 2000.

MENDES, J. O. B.; BURNS, P. D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL, G. E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 331-340, 2003.

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine Spermatozoa and Modulate Capacitation by Heparin. **Biology of reproduction**, v. 42, 1990.

MORTIMER, S. T. CASA—Practical Aspects **Journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S. T.; SWAN, A. M.; MORTIMER, D. M. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2139-2146, 1998.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-11, 2006.

MURTA, D.; BATISTA, M.; SILVA, E.; TRINDADE, A.; HENRIQUE, D.; DUARTE, A.; LOPES-DA-COSTA, L. Notch signaling in the epididymal epithelium regulates sperm motility and is transferred at a distance within epididymosomes. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 314-27, 2016.

OH, J.; WOO, J. M.; CHOI, E.; KIM, T.; CHO, B. N.; PARK, Z. Y.; KIM, Y. C.; KIM, D. H.; CHO, C. Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 331, n. 4, p. 1374-83, 2005.

OHTO, U.; ISHIDA, H.; KRAYUKHINA, E.; UCHIYAMA, S.; INOUE, N.; SHIMIZU, T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. **Nature**, v. 534, n. 7608, p. 566-9, 2016.

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

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, 1995.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; HANDROW, R. R.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biology of reproduction**, v. 40, n. 5, p. 1020-5, 1989.

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

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-80, 1988.

PAUNESCU, T. G.; SHUM, W. W. C.; HUYNH, C.; LECHNER, L.; GOETZE, B.; BROWN, D.; BRETON, S. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. **Molecular human reproduction**, v. 20, p. 929–937, 2014.

PAYNE, D.; FLAHERTY, S. P.; BARRY, M. F.; MATTHEWS, C. D. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. **Human reproduction**, v. 12, p. 532-541, 1997.

PENA, F. J. Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 6, p. 731-7, 2007.

RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; GARCIA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; PEREZ-GUZMAN, M. D.; GARDE, J. J. Understanding sperm heterogeneity: biological and practical implications. **Reproduction in domestic animals**, v. 49 Suppl 4, p. 30-6, 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S138-46, 2007.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR, L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 540-54, 2016.

RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J. J.; ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; RODRÍGUEZ-GÍL, J. E.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, 2007.

SAEKI, K.; SUMITOMO, N.; NAGATA, Y.; KATO, N.; HOSOI, Y.; MATSUMOTO, K.; IRITAN, A. Fine surface structure of bovine acrosome-intact and reacted spermatozoa observed by atomic force microscopy. **Journal of reproduction and development**, v. 51, p. 293-298, 2005.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRIC, J.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal reproduction science**, v. 91, n. 3-4, p. 237-47, 2006.

SAPANIDOU, V.; TAITZOGLOU, I.; TSAKMAKIDIS, I.; KOURTZELIS, I.; FLETOURIS, D.; THEODORIDIS, A.; ZERVOS, I.; TSANTARLIOTOU, M. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1273-82, 2015.

SCHIMMING, B. C.; PINHEIRO, P. F. F.; VICENTINI, C. A.; DOMENICONI, R. F. Ultrastructure of the epithelium lining of cauda epididymidis in mongrel dogs. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 32, n. 1, p. 32-36, 2012.

SHALGI, R.; SELIGMAN, J.; KOSOWER, N. S. Dynamics of the Thiol Status of Rat Spermatozoa during Maturation: Analysis with the Fluorescent Labeling Agent Monobromobimane. **Biology of reproduction**, v. 40, p. 1037-1045, 1989.

SHARMA, U.; CONINE, C. C.; SHEA, J. M.; BOSKOVIC, A.; DERR, A. G.; BING, X. Y.; C., B.; KUCUKURAL, A.; SERRA, R. W.; SUN, F.; SONG, L.; CARONE, B. R.; RICCI, E. P.; LI, X. Z.; FAUQUIER,

L.; MOORE, M. J.; SULLIVAN, R.; MELLO, C. C.; GARBER, M.; RANDO, O. J. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. **Science**, p. 1110-1126, 2015.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 765-82, 2012.

SILVA, L. P. Imaging Proteins with Atomic Force Microscopy: An Overview. **Current protein and peptide science**, v. 6, p. 387-395, 2005.

SILVA, P. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-78, 2006.

SILVEIRA, J. C.; AVILA, A.; GARRETT, H. L.; BRUEMMER, J. E.; WINGER, Q. A.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. **The journal of endocrinology**, v. 236, n. 1, p. R15-R27, 2018.

SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 30, n. 1, p. 28-38, 2015.

STANDERHOLEN, F. B.; MYROMSLIEN, F. D.; KOMMISRUUD, E.; ROPSTAD, E.; WATERHOUSE, K. E. Comparison of electronic volume and forward scatter principles of cell selection using flow cytometry for the evaluation of acrosome and plasma membrane integrity of bull spermatozoa. **Cytometry. Part A** v. 85, n. 8, p. 719-28, 2014.

STOUT, M. A. **Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls**. 2012. 203 (PhD). School of Animal Sciences, University of Louisiana, Louisiana.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W. E.; SCHATTEEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of cell science**, v. 114, p. 1665-1675, 2001.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

TULSIANI, D. P.; SKUDLAREK, M. D.; HOLLAND, M. K.; ORGEBIN-CRIST, M. Glycosylation of Rat Sperm Plasma Membrane during Epididymal Maturation. **Biology of reproduction**, v. 48, p. 417-428, 1993.

TUNG, C. K.; ARDON, F.; FIORE, A. G.; SUAREZ, S. S.; WU, M. Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. **Lab on a chip**, v. 14, n. 7, p. 1348-56, 2014.

VIANNA, L. L.; PRADIEÉ, J.; SANTOS, E. C. S.; GONÇALVES, A. O.; PFEIFER, L. F. M.; RHEINGANTZ, M. G. T.; DODE, M. A. N.; VIEIRA, A. D.; LIMA, V. F. H.; CORREA, M. N.; PEGORARO, L. M. C. Isolate and Optiprep minigradients as alternatives for sperm selection in bovine in vitro embryo production. **Canadian journal of animal science**, v. 94, n. 1, p. 35-42, 2014.

VICENTE-CARRILLO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. **Reproductive biology**, p. 2-10, 2016.

VISCONTI, P. E.; FLORMAN, H. M. Mechanisms of sperm-egg interactions: between sugars and broken bonds. **Science signaling**, v. 3, n. 142, p. pe35, 2010.

WHITED, A. M.; PARK, P. S. Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 1 Pt A, p. 56-68, 2014.

WOLFE, C. A.; JAMES, P. S.; MACKIE, A. R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 1506-1414, 1998.

XU, Y. R.; YANG, W. X. Calcium influx and sperm-evoked calcium responses during oocyte maturation and egg activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 51, p. 89375-89390, 2017.

YOON, S. J.; KWON, W. S.; RAHMAN, M. S.; LEE, J. S.; PANG, M. G. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. **Plos one**, v. 10, n. 5, p. e0126232, 2015.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO

**Cunha, A.T.M.¹, Carvalho, J.O.², Guimarães, A.L.S.³, Leme, L.O.², Caixeta, F.M.³, Viana,
J.H.M.⁴, Dode, M.A.N.^{1,4}.**

- 1- Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;
- 2- Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Espírito Santo, Alegre, Brasil;
- 3- Faculdade de Agricultura e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasil;
- 4- Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

Artigo publicado na revista Plos ONE, 2019 Jan 7;14(1):1-18

DOI: 10.1371/journal.pone.0209692

RESUMO EXPANDIDO

RESUMO

A produção in vitro de embriões (PIVE) utilizando espermatozoides recuperados do epidídimo (EP) permite a multiplicação de material genético de animais de produção ou silvestres. Entretanto, estudos são necessários para o desenvolvimento de metodologias específicas para tornar mais eficiente o uso de EP nas técnicas de reprodução assistida. Portanto, o objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo para uso de EP na PIVE de bovinos. Para isso, o efeito da presença de heparina, de diferentes métodos de seleção espermática e de diferentes períodos de co-incubação na fecundação e no desenvolvimento embrionário in vitro foram avaliados. Os resultados mostraram que a heparina acelera a fecundação e permite reduzir do tempo de co-incubação dos gametas sem afetar a produção e qualidade do embrião. Além disso, a seleção de EP pode ser realizada utilizando o gradiente PureSperm ou Percoll, no entanto, o uso desses gradientes gerou um desvio na proporção do sexo dos embriões PIV.

Palavras-chave: Biotecnologia; sêmen; gametas.

INTRODUÇÃO

Com a morte inesperada de um animal ou o surgimento de doenças que afetem sua capacidade reprodutiva, a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo (EP), representa uma biotécnica que permite o armazenamento de gametas que de outra forma seriam perdidos. Os EP podem ser utilizados em várias técnicas de reprodução assistida (TRAs) tais como a inseminação artificial (IA) e a produção in vitro de embriões (PIVE) (Martins *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2011).

Após a espermatogênese os gametas vão para o epidídimo, onde são maturados e permanecem armazenados até a ejaculação, momento em que entram em contato com o plasma seminal e ocorre a formação do sêmen. O plasma seminal é composto por um conjunto de moléculas importantes (Moura *et al.*, 2006; Juyena e Stelletta, 2012) incluindo proteínas que fornecem à célula maior estabilidade de membrana, sítios específicos que atuam na interação

com a heparina, formação do reservatório do istmo, capacitação e interação espermatozoide-ovócito (Gwathmey *et al.*, 2006; Juyena e Stelletta, 2012). Desta forma, os EP diferem dos espermatozoides do ejaculado (EJ) por não serem expostos ao plasma seminal, essas diferenças fisiológicas podem interferir em fatores como a longevidade, vias de capacitação e potencial de fecundação.

A literatura relata o uso de EP na PIVE (Fraser e Drury, 1976; Martins *et al.*, 2007; Matas *et al.*, 2010; Krishnakumar *et al.*, 2011; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016) no entanto, as taxas embrionárias apresentam grande variação. Alguns estudos mostram similaridade entre a produção de embriões utilizando EP e EJ (Martins *et al.*, 2009; Stout, 2012; Chaveiro *et al.*, 2015; Bertol *et al.*, 2016), enquanto outros mostram menor taxa ao utilizar EP (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016).

Os protocolos para o preparo de espermatozoides utilizados na PIVE são bem estabelecidos, sendo que estudos relatam a importância da seleção espermática (Dode *et al.*, 2002; Matas *et al.*, 2010; Vianna *et al.*, 2014), da suplementação do meio de fecundação (MF) com heparina (Mendes *et al.*, 2003; Stout, 2012; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016) bem como do tempo mínimo necessário para a co-incubação entre espermatozoide-ovócito (Dode *et al.*, 2002). Entretanto, estudos que avaliem esses procedimentos utilizando EP são escassos e/ou inexistente. Considerando a importância da preparação dos espermatozoides para PIVE (Dode *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2003; Matas *et al.*, 2010; Vianna *et al.*, 2014), a falta de consistência e repetibilidade nos resultados de produção embrionária com o uso de EP, pode ser relacionada ao protocolo utilizado. Na maioria dos estudos, os protocolos estabelecidos para o uso de EJ na PIVE também são utilizados para o uso de EP, desconsiderando as possíveis diferenças fisiológicas existentes entre EP e EJ.

Portanto, com o objetivo de investigar o comportamento de EP durante a PIVE, o efeito da heparina na viabilidade, longevidade e taxas de fecundação, o efeito dos métodos de seleção espermática e, o tempo de co-incubação necessário para que se alcance o máximo de estruturas fecundadas foram avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado utilizando EP e EJ criopreservados, coletados de sete touros da raça Gir (*Bos indicus*) utilizados em estudos anteriores (Cunha *et al.*, 2016). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Para a avaliação da longevidade e viabilidade foram realizadas sete repetições, onde cada animal foi avaliado individualmente. Para as demais etapas foram utilizados pools compostos por EP (n=7) e por EJ (n=7).

Inicialmente foi avaliado o efeito da heparina na viabilidade, longevidade e taxas de fecundação. EP e EJ foram incubados em meio fecundação suplementado com 10µg/ml de heparina (H), formando três grupos: EJ com H (EJ+H), EP com H (EP+H) e EP sem H (EP-H). Os grupos foram incubados a 39°C por 18h e amostras foram avaliadas às 0, 3, 6, 12 e 18h de incubação. A cada momento foi avaliada a motilidade total e progressiva pelo CASA, e a integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, e estabilidade da membrana plasmática por citometria de fluxo. Para a avaliação da taxa de fecundação, os mesmos grupos foram co-incubados em meio de fecundação suplementado ou não com heparina com um total de 829 COCs em sete réplicas. Após a fecundação, as estruturas foram removidas às 3h, 6h, 12h e 18h, desnudadas, fixadas, coradas com lacmóide e avaliadas em microscopia de contraste de fase. Os dados de viabilidade, longevidade e motilidade espermática foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de testes de comparação múltipla de Tukey-Kramer usando o SAS versão 9.4 (SAS virtual University Edition). As análises consideraram os efeitos do grupo, tempo e suas interações. O procedimento SAS *MIXED REPEATED* foi utilizado para considerar a autocorrelação entre as mensurações sequenciais. As taxas de fecundação foram analisadas pelo Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Para a avaliação do efeito dos métodos de seleção espermática, três métodos foram utilizados: gradiente de Percoll (P) 45%90% (GE Healthcare Bio Science, Uppsala, Suécia), gradiente PureSperm (PS) 40%80% (Nidacon Laboratories AB, Gothenborg, Suécia) e lavagem em Lactato e Piruvato de Albumina Tyrode (SpTALP). Quatro grupos foram formados: controle, EJ selecionado em P (EJ-P); EP selecionado em P (EP-P); EP selecionado em PS (EP-PS) e EP

selecionado em SpTALP (EP-T). Após a seleção as amostras foram co-incubadas com um total de 759 COCs em sete réplicas.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado quanto a clivagem no dia (D) 2, D6, D7, e D8 de cultivo. Após oito dias de cultivo, todos os embriões produzidos foram armazenados para sexagem, a qual foi avaliada utilizando a técnica de PCR. A produção embrionária e os dados da sexagem foram analisados utilizando o teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Por fim, a última etapa foi realizada com o objetivo de estabelecer o tempo de co-incubação necessário para que se alcance o máximo de estruturas fecundadas. Para isso foram utilizados quatro grupos: EJ18h, grupo controle em que ovócitos e EJ foram co-incubados por 18h) EP6h, co-incubação com EP por 6h; EP12h, co-incubação com EP por 12h; e EP18h, co-incubação com EP por 18h. Foram realizadas cinco réplicas, com um total de 627 ovócitos. Após a fecundação as estruturas foram avaliadas no D2 quanto a clivagem, e nos D6 e D7 para a taxa de blastocistos. No D7, os blastocistos expandidos foram avaliados quanto ao número total e número de células apoptóticas, utilizando o método Transferase desoxynucleotidil Terminal dUTP (TUNEL). Os dados de desenvolvimento embrionário foram analisados pelo Qui-quadrado ($P \leq 0,05$). A análise dos resultados obtidos no teste do TUNEL foram submetidas a ANOVA e comparados através do teste de Tukey, utilizando o programa Prophet 5.0 ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Nas avaliações de viabilidade e longevidade foi possível observar que após 3h de incubação o grupo EP-H apresentou maior motilidade total ($33 \pm 2,3 \times 18 \pm$ %) e progressiva ($25 \pm 2,4 \times 12 \pm 3,8\%$) do que o grupo EP+H, que foi similar ao EJ+H. Para os demais momentos e parâmetros não foram observadas diferenças. A taxa de fecundação foi maior às 3h de co-incubação para os grupos EP+H e EP-H e menor para EJ+H (Tabela 1). No entanto, após 6h, 82% dos ovócitos do grupo EP+H foram fecundados, sendo superior a EJ+H e EP-H (Tabela 1). Após 12h e 18h de fecundação, a quantidade de estruturas fecundadas foi maior nos grupos EP+H e EP-H (Tabela 1).

Nos diferentes métodos de seleção espermática, os resultados de produção de blastocistos em D7 e D8 apresentaram taxas similares entre os grupos EP-P e EP-PS (Tabela 2).

Os grupos EP-T e EJ-P foram similares quanto à produção de embriões em D6, D7 e D8 (Tabela 2), sendo inferiores aos demais.

Tabela 1. Taxa de fecundação de ovócitos inseminados com espermatozoides do ejaculado (EJ), espermatozoides do epidídimo na presença (+H) heparina (EP+H) e espermatozoides do epidídimo na ausência (-H) de heparina (EP-H) após 3h, 6h, 12h e 18h de co-incubação.

| Grupos | Momento | N ovócitos | Fecundação | |
|--------|---------|------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | | Fecundado | Polispermia |
| EJ+H | 3h | 75 | 3 (4%) ^{a,A} | 0 (0%) ^{A,a} |
| EP+H | 3h | 75 | 23 (30,7%) ^{b,A} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EP-H | 3h | 58 | 15 (25,8%) ^{b,A} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EJ+H | 6h | 56 | 11 (19,6%) ^{a,B} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EP+H | 6h | 74 | 61 (82,4%) ^{b,B} | 4 (5%) ^{a,B,C} |
| EP-H | 6h | 69 | 29 (42%) ^{c,B} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EJ+H | 12h | 67 | 45 (67,1%) ^{a,C} | 5 (7%) ^{b,B,C} |
| EP+H | 12h | 70 | 62 (88,5%) ^{b,B} | 9 (12%) ^{b,B} |
| EP-H | 12h | 69 | 53 (76,8%) ^{a,b,C} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EJ+H | 18h | 69 | 59 (85,5%) ^{a,D} | 0 (0%) ^{a,A} |
| EP+H | 18h | 75 | 75 (100%) ^{b,C} | 10 (13%) ^{b,B} |
| EP-H | 18h | 72 | 63 (87,5%) ^{a,C} | 2 (2%) ^{a,C} |

a, b, c Médias seguidas de letras diferentes dentro de cada momento indicam diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$).

A, B, C, D Médias seguidas de letras diferentes dentro de cada grupo indicam diferença entre os momentos ($P \leq 0,05$).

Os diferentes momentos de co-incubação, apresentados na Tabela 3, mostraram resultados similares para as taxas de clivagem e produção embrionária em D6 e D7. Além disso, todos os tratamentos foram similares quanto ao número total de células e porcentagem de células apoptóticas: EJ18h (158; 4,0%), EP6h (174; 4,0%) EP12h (164; 4,2%) e EP18h (173; 4,0%).

Pode-se concluir que a suplementação com heparina resulta em maiores taxas de fecundação e permite que o tempo de co-incubação seja reduzido para 6h, sem que a produção ou qualidade embrionária sejam afetados. Além disso, maior produção embrionária é obtida com o uso de EP selecionado em PS ou P, no entanto, maior quantidade de embriões macho foi observada.

Tabela 2. Taxa de clivagem e produção de blastocistos nos dias 6, 7 e 8 de cultivo utilizando para inseminação espermatozoides do ejaculado selecionados em Percoll (controle), espermatozoides do epidídimo (EP) selecionados em Percoll (EP-P) PureSperm (EP-PS) ou lavado em meio spTALP (EP-T).

| Tratamento | N ovócitos | Clivagem D2] N (%) | Produção embrionária | | |
|------------|------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | | Blastocistos D6 N (%) | Blastocistos D7 N (%) | Blastocistos D8 N (%) |
| | | | Total | Total | Total |
| Controle | 181 | 136 (75%) ^{a,b} | 59 (33%) ^b | 80 (44%) ^{b,c} | 82 (45%) ^{a,b} |
| EP-P | 197 | 157 (80%) ^{a,b} | 73 (37%) ^b | 106 (54%) ^a | 110 (56%) ^a |
| EP-T | 177 | 127 (72%) ^b | 49 (28%) ^b | 66 (37%) ^c | 67 (38%) ^b |
| EP-PS | 204 | 164 (80%) ^a | 96 (47%) ^a | 107 (52%) ^{a,b} | 110 (54%) ^a |

^{a, b, c} Médias seguidas de letras diferentes dentro de cada coluna diferem os grupos ($P \leq 0,05$).

Tabela 3. Taxa de clivagem e produção de blastocistos nos dias 6 e 7 de cultivo utilizando para inseminação espermatozoides do ejaculado (EJ) e do epidídimo (EP) co-incubados com ovócitos durante 18 horas (EJ 18h; EP 18h), seis horas (EP 6h) ou doze horas (EP 12h).

| Grupo | N. ovócitos | Clivagem | Blastocisto | |
|--------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | | D2 | D6 | D7 |
| | | Total (%) | Total (%) | Total (%) |
| EJ 18h | 155 | 121 (78%) | 38 (25%) | 65 (42%) |
| EP 6h | 164 | 121 (74%) | 43 (26%) | 63 (38%) |
| EP 12h | 153 | 118 (77%) | 37 (24%) | 61 (40%) |
| EP 18h | 155 | 127 (82%) | 40 (26%) | 71 (46%) |

Não houve diferença entre grupos ($P > 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOL, M. A.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; ABREU, A. C.; PEREIRA, J. F.; DA SILVA, J. J. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 degrees C-20 degrees C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014-21, 2016.

CHAVEIRO, A.; CERQUEIRA, C.; SILVA, J.; FRANCO, J.; F, M. D. S. Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 2, p. 188-193, 2015.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F.; FRANCO, V. O.; REZENDE, L. O. F.; SERENO, J. R. B.; CAMPOS, H. C. F. Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine. **Ciência rural**, v. 41, n. 5, p. 869-874, 2011.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; KUSSANO, N. R.; MARTINS, C. F.; MOURAO, G. B.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 348-355, 2016.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes **Animal reproduction science**, v. 69, p. 15-23, 2002.

FRASER, L. R.; DRURY, L. M. Effect of removal of epididymal secretions on fertilization in vitro of mouse eggs. **Journal reproduction fertility**, v. 48, p. 125-128, 1976.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, 2006.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012.

KRISHNAKUMAR, S.; WHITESIDE, D. P.; ELKIN, B.; THUNDATHIL, J. C. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 252-60, 2011.

MARTINS, C. F.; DRIESSEN, K.; COSTA, P. M.; CARVALHO-NETO, J. O.; DE SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M. N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. **Animal reproduction science**, v. 116, n. 1-2, p. 50-7, 2009.

MARTINS, C. F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D. C.; DODE, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal reproduction science**, v. 101, n. 3-4, p. 326-31, 2007.

MATAS, C.; SANSEGUNDO, M.; RUIZ, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; ROMAR, R.; COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1327-40, 2010.

MENDES, J. O. B.; BURNS, P. D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL, G. E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 331-340, 2003.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-11, 2006.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR, L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 540-54, 2016.

STOUT, M. A. **Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls**. 2012. 203 (PhD). School of Animal Sciences, University of Louisiana, Louisiana.

VIANNA, L. L.; PRADIEÉ, J.; SANTOS, E. C. S.; GONÇALVES, A. O.; PFEIFER, L. F. M.; RHEINGANTZ, M. G. T.; DODE, M. A. N.; VIEIRA, A. D.; LIMA, V. F. H.; CORREA, M. N.; PEGORARO, L. M. C. Isolate and Optiprep minigradients as alternatives for sperm selection in bovine in vitro embryo production. **Canadian journal of animal science**, v. 94, n. 1, p. 35-42, 2014.

ARTICLE 1**BOVINE EPIDIDYMAL SPERMATOZOA TREATMENT FOR IN VITRO FERTILIZATION:
HEPARIN ACCELERATES FERTILIZATION AND ENABLES A REDUCTION IN COINCUBATION
TIME**

Andrielle T. M. Cunha¹, José O. Carvalho², Ana L. S. Guimarães³, Ligiane O. Leme², Felipe M. Caixeta³, João H. M. Viana⁴, Margot A. N. Dode^{1,3,4}

1 Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil;

2 Veterinary Medicine Department, University of Espírito Santo, Alegre, Brazil;

3 School of Agriculture and Veterinary, University of Brasília, Brasília, Brazil;

4 Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil.

ABSTRACT

This study aimed to establish a protocol for in vitro embryo production using epididymal sperm (EP). Samples were obtained from ejaculated sperm (EJ) and epididymis of 7 Gir bulls. First, the effect of heparin (+) on the viability, longevity (Experiment 1) and fertilization rates (Experiment 2) of the EP was evaluated. In experiment 2, a pool of EP and EJ sperm (n = 7) was coincubated with cumulus-oocyte complexes (COCs) for 0, 3, 6, 12 and 18 h, and the fertilization rate (FR) was evaluated. A third experiment was performed to test sperm treatments for IVP using the Percoll (P) or PureSperm (PS) gradients or a spTALP wash for sperm selection. Cleavage, blastocyst rate (BR) and embryo sex were evaluated. In experiment 4, embryos were produced using 6, 12, and 18 h of sperm-oocyte coincubation. The cleavage, BR, and total number and percentage of apoptotic cells were determined. Heparin affected EP viability, longevity and FR. After 6 h, 82% of the oocytes were fertilized in the EP+ group, a higher value ($P < 0.05$) than that in the EJ (19%) and EP- (42%) groups. At 12 and 18 h, FR remained higher in the EP+ group, and a gradual increase in polyspermy was observed. The use of a P or PS gradient yielded a similar BR on D7 (54% and 52%), which was higher than the rate obtained using the washing method (37%). The embryos produced by EP and selected in a P or PS gradient resulted in a sex deviation in favor of male embryos ($P > 0.05$). No differences ($P > 0.05$) were observed among the groups that were coincubated for 6, 12 and 18 h with respect to embryo

production, kinetics of development, total cell number and percentage of apoptotic cells. In conclusion, IVF time can be reduced to 6 h without affecting embryo production and quality. In addition, EP sperm selection can be performed by either a PS or P gradient.

INTRODUCTION

Genetic material from animals of economic interest, wild animals or endangered species may be lost at any time by unexpected death or by acquired reproductive failure. In most of these cases, there is a loss of genetic material, as well as an economic loss. Therefore, efforts should be made to avoid the waste of that material, which can be achieved through the use of different assisted-reproduction biotechnologies. In fact, various assisted-reproduction techniques (ARTs) are currently available and are important tools to enable the storage and future use of this material.

The recovery and cryopreservation of epididymal sperm (EP) is one of these alternatives, because this process allows the preservation of male gametes and the maintenance of germ- plasm banks [1, 2]. These spermatozoa can be used in artificial insemination (AI) or in vitro embryo production (IVP), either by intracytoplasmic injection (ICSI) or by in vitro fertilization (IVF) [3,4].

After leaving the testicles, spermatozoa are stored in the tail of the epididymis and at the moment of ejaculation, come in contact with the fluids secreted by the accessory glands, forming semen. These secretions contain several factors, including ions, lipids, energetic substrates, organic compounds and proteins [5, 6], that are important for the survival and transport of spermatozoa in the female reproductive tract [6]. In addition, proteins secreted in seminal plasma are important factors in membrane stability, heparin binding, the formation of the isthmus reservoir, sperm capacitation, and spermatozoa-oocyte interaction [6, 7]. Therefore, EP differ from EJ sperm, mainly because the former have not been exposed to accessory gland fluids. Additionally, EP sperm have had no contact with substances that are known to be important for the fertilization process. This lack of contact with seminal plasma can affect various aspects of the spermatozoa physiology, such as longevity, capacitation pathways and fertilizing potential.

Studies have shown that EP is more resistant than EJ and presents greater viability

after refrigeration and longevity after thawing [8]. Considering these results, it can be assumed that other aspects related to sperm functionality are also different between EP and EJ. These differences, if any, need to be taken into account when EP is used in ARTs.

Several studies have reported the use of bovine sperm recovered from the epididymis tail in bovine IVP [3, 4, 9, 10, 11, 12, 13]; however, the results of bovine embryo production when this type of sperm is used are variable and inconsistent. Some reports showed a similar embryo rate [4, 9, 11, 14] and others showed a lower embryo rate [15] than those obtained with EJ. The lack of consistency in the results can be due to the preparation of EP sperm for the in vitro fertilization step, which usually is the same as that used for EJ sperm. Therefore, the possible physiological differences between EP and EJ are disregarded. In fact, studies in pigs have shown that methods of processing spermatozoa can affect the in vitro fertilization parameters [13].

The various steps involved in the IVF, such as the sperm selection process and its influence on quality and embryo sex [16, 17, 18], the presence and concentration of heparin in fertilization media [11, 15, 17] and the time necessary for sperm-oocyte coincubation [19], are well established for EJ sperm. However, in regard to the use of EP, little is known regarding the changes that the sperm experience after being exposed to the different treatments and in vitro conditions.

Therefore, we aimed to investigate how EP behave in the face of various procedures needed to perform IVF. Next, we evaluated the effect of heparin on EP sperm viability and longevity, as well as its effect on fertilization and embryo development. We additionally attempted to determine the best selection method and the coincubation time in which the majority of the oocytes would be fertilized.

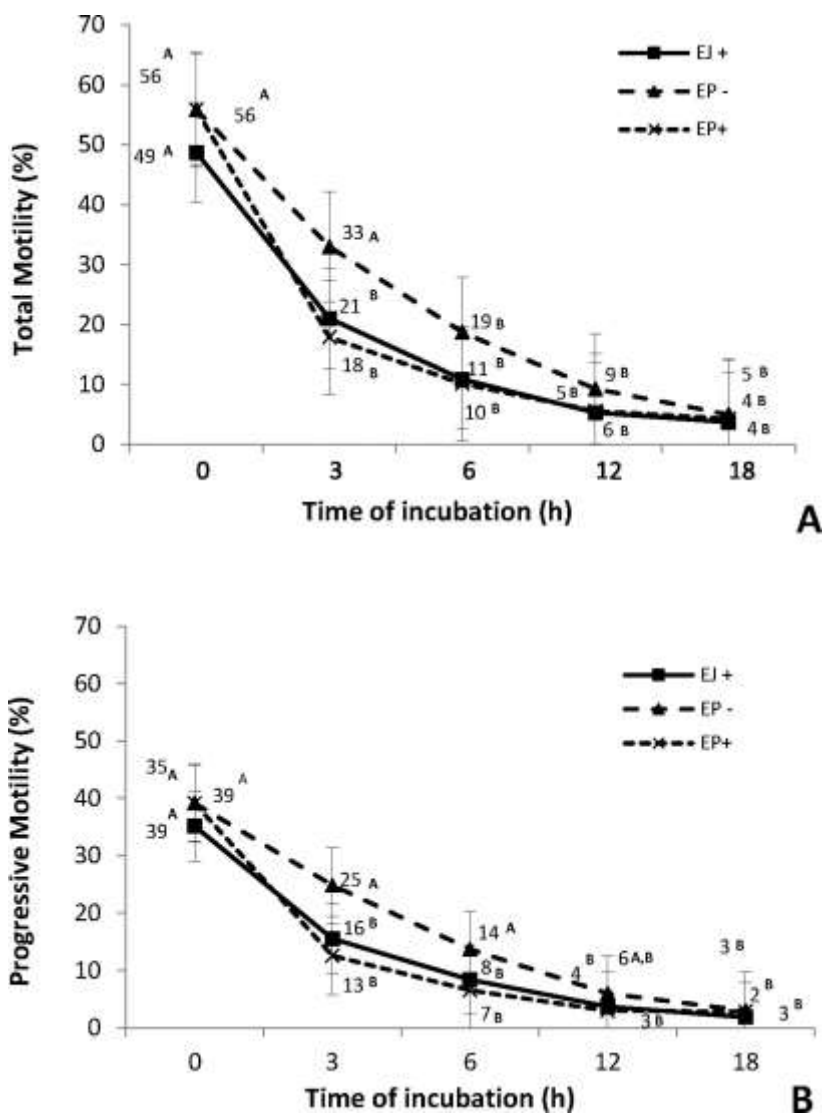


Fig 1. Percentage of total (A) and progressive motility (B) at different time points of ejaculated (EJ) and epididymal (EP) sperm cultured in fertilization medium in the presence (EP+) or absence of heparin in (EP-).

^{A, B} Different letters in the line indicate a difference in time points (0, 3, 6, 12 and 18 hours) within each group, analyzed by Tukey-Kramer test ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Experiment 1: Effect of heparin on viability and longevity of epididymal sperm

Total and progressive motility (Fig 1) were similar among all groups at all incubation time points. However, a decrease in total and progressive motility was observed for the EJ+

and EP+ groups after 3 h of incubation, while in the group EP-, this decrease only occurred after 6 h for total motility and after 12 h for progressive motility.

Similar to the motility results, the percentage of cells with intact plasma membrane at the onset of incubation was similar for all groups (Fig 2). At 3 h of incubation, all groups already showed a decrease in the percentage of sperm with intact plasma membrane; however, after that time point, the proportion did not change with time. Regarding the percentage of apoptotic sperm cells, no difference was observed among the groups at any of the time points during incubation ($P>0.05$). Since all groups showed that less than 1% of cells were stained with the pattern characteristic of apoptotic status, we chose not to present the data.

The presence of heparin in the IVF medium similarly affected the mitochondrial potential (Fig 3), the acrosome integrity (Fig 2) and the plasma membrane stability (Fig 3). By 3 h of incubation, the EJ and EP+ sperm groups presented a reduction on both parameters, while in the EP-, this decrease was only evident at 6 h (Figs 2 and 3).

Experiment 2: Effect of heparin on fertilization rates

After 3 h of sperm and oocyte coincubation, the percentage of fertilized oocytes was similar between the EP+ and EP- groups and was higher than that in the EJ group (Tab. 1). However, at 6 h of coincubation, the presence of heparin affected the ability of sperm from the epididymis to fertilize oocytes, as the epididymal-sperm group exposed to heparin showed the highest percentage of fertilized oocytes (Table 1).

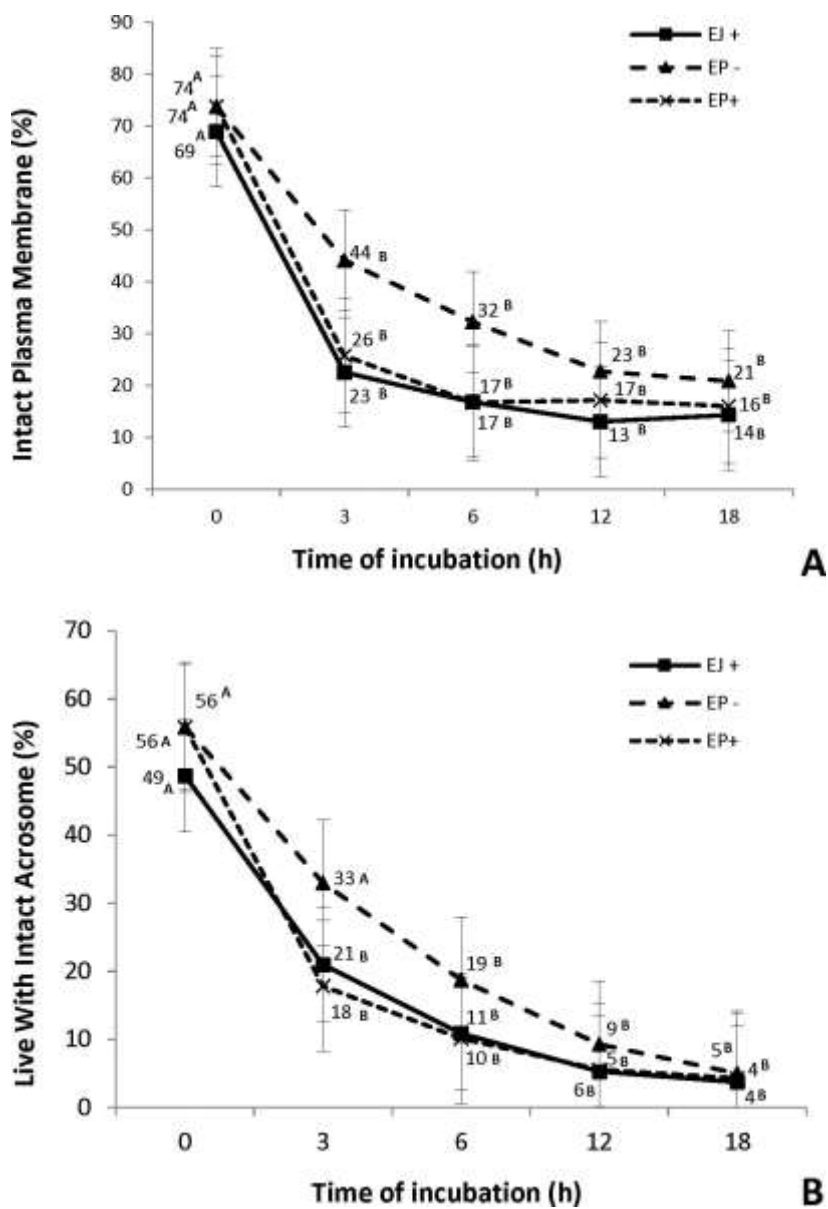


Fig 2. Percentage intact plasma membrane (A) and live cells with intact acrosome (B) at different time points of ejaculated (EJ) and epididymal (EP) sperm cultured in fertilization medium in the presence (EP+) or absence of heparin in (EP-). ^{A, B} Different letters in the line indicate a difference in time points (0, 3, 6, 12 and 18 hours) within each group, analyzed by Tukey-Kramer test ($P \leq 0.05$).

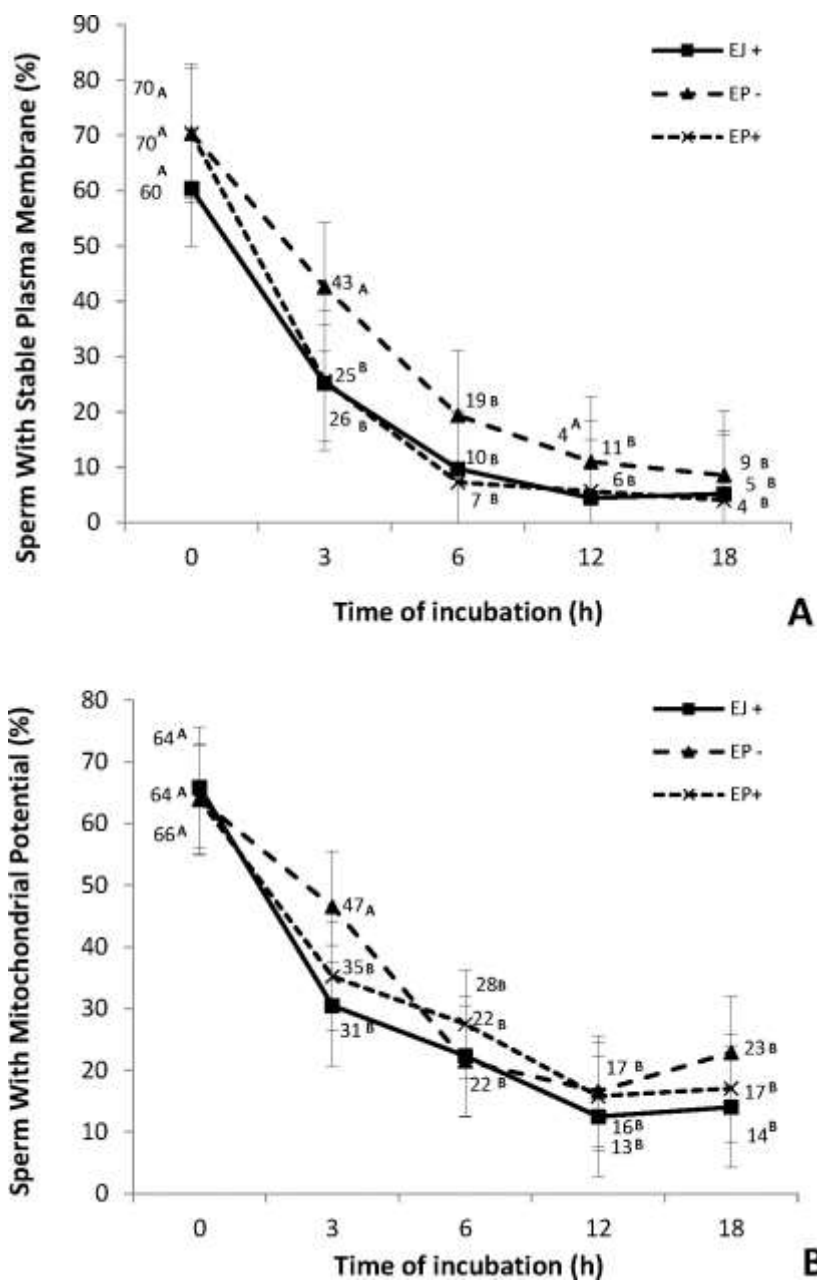


Fig 3. Percentage of cells with stable plasma membrane (A) and potential mitochondrial (B) at different time points of ejaculated (EJ) and epididymal (EP) sperm cultured in fertilization medium in the presence (EP+) or absence of heparin in (EP-). ^{A, B} Different letters in the line indicate a difference in time points (0, 3, 6, 12 and 18 hours) within each group, analyzed by Tukey-Kramer test ($P \leq 0.05$).

Table 1. Fertilization rate of bovine oocytes co-incubated for 3, 6, 12 or 18 hours with ejaculated (EJ) and epididymal (EP) sperm in the absence (EP-) and presence of heparin (EP+).

| Treatment | Time of Evaluation | N Oocytes | Fertilized | |
|-----------|--------------------|-----------|------------------------------|--------------------------|
| | | | Total N (%) | Polyspermy N (%) |
| EJ+ | 3 h | 75 | 3 (4.0) ^{a, A} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP- | 3 h | 58 | 15 (25.8) ^{b, A} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP+ | 3 h | 75 | 23 (30.7) ^{b, A} | 0 (0) ^{a, A} |
| EJ + | 6 h | 56 | 11 (19.6) ^{a, B} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP- | 6 h | 69 | 29 (42.0) ^{c, B} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP+ | 6 h | 74 | 61 (82.4) ^{b, B} | 4 (5) ^{a, B, C} |
| EJ + | 12 h | 67 | 45 (67.1) ^{a, C} | 5 (7) ^{b, B, C} |
| EP - | 12 h | 69 | 53 (76.8) ^{a, b, C} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP + | 12 h | 70 | 62 (88.5) ^{b, B} | 9 (12) ^{b, B} |
| EJ + | 18 h | 69 | 59 (85.5) ^{a, D} | 0 (0) ^{a, A} |
| EP - | 18 h | 72 | 63 (87.5) ^{a, C} | 2 (2) ^{a, C} |
| EP + | 18 h | 75 | 75 (100) ^{b, C} | 10 (13) ^{B, b} |

^{a, b, c} Values with different superscripts in the same time of evaluation are significantly different, analyzed by chi-squared test ($P \leq 0.05$).

^{A, B, C, D} Values with different superscripts in the columns indicate differences between time-points of each treatment, analyzed by chi-squared test ($P \leq 0.05$).

At 3 h of coincubation, regardless of the presence of heparin, the EP groups had higher fertilization rate than the groups receiving EJ sperm (Table 1). However, at 6 h of incubation, the effect of heparin on EP sperm was evident; the percentage of fertilized oocytes was higher than that in the EP- and EJ groups. After 12 h, the percentage of presumptive zygotes increased in the EP- and EJ groups but remained the same for the EP+ group. At 18 h of coincubation, the EJ group exhibited an increase in fertilization rate, which was similar to that observed for the EP+ group. An increase in fertilization rates was also observed at 18 h for the EP+ group. It is important to note that although the fertilization rate for this group was similar at 6 and 12 h, a gradual increase in polyspermy also occurred.

Experiment 3: Effect of the epididymal-sperm selection method on in vitro embryo production and embryo sex

The cleavage rate was affected by sperm treatment since the EP sperm washed in spTALP showed a lower rate than the EP sperm selected by the PS gradient (Table 2). The finding of the lowest embryo production in the washed group compared to the gradient selection groups was maintained until the end of embryo development. On D6, the blastocyst rate was higher when the epididymal sperm was selected by PS (Table 2).

However, this difference was not observed on D7 and D8, when the EP sperm selected using P and PS exhibited a similar blastocyst rate (Table 2). Regarding development kinetics (Table 3), in the EP group washed in spTALP, most of the embryos were in the initial blastocyst (Bi) stage. On D7, the EP group selected by PS produced more expanded blastocysts (Bx) than the EJ group selected in P. However, EP-P and EP spTALP were similar in all groups. On D8, no difference was observed in embryo development.

To verify if the method used for sperm selection would affect the male:female ratio, we sexed all the embryos produced (Fig 4). The results showed that the embryos produced with the epididymal sperm selected via the 45–90% P gradient and the 40–80% PS gradient exhibited a higher number of male embryos ($P < 0.05$).

Table 2. Cleavage on D2 and blastocyst rates on days 6, 7 and 8 of culture using ejaculated sperm selected in Percoll (EJ-P), and epididymal sperm (EP) selected in Percoll (EP-P), PureSperm (EP-PS) or washed in spTALP (EP-spTALP). Fertilization medium of all treatments was supplemented with 10 µg/mL of heparin.

| Treatment | N oocytes | Embryo Development | | | |
|-----------|-----------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Cleavage D2 N (%) | Blastocyst D6 N (%) | Blastocyst D7 N (%) | Blastocyst D8 N (%) |
| EJ-P | 181 | 136 (75%) ^{a,b} | 59 (33%) ^b | 80 (44%) ^{b,c} | 82 (45%) ^{a,b} |
| EP-P | 197 | 157 (80%) ^{a,b} | 73 (37%) ^b | 106 (54%) ^a | 110 (56%) ^a |
| EP-spTALP | 177 | 127 (72%) ^b | 49 (28%) ^b | 66 (37%) ^c | 67 (38%) ^b |
| EP-PS | 204 | 164 (80%) ^a | 96 (47%) ^a | 107 (52%) ^{a,b} | 110 (54%) ^a |

^{a, b, c} Means followed by different letters within each column differ between groups analyzed by chi-squared test ($P \leq 0.05$).

Experiment 4: Effect of coincubation time of EP sperm and oocyte on embryo production

To confirm that the 6 h of coincubation for IVF with EP sperm would not affect embryo production, we evaluated the embryo rate and quality. The results showed that the time of incubation affected neither the cleavage nor the blastocyst rate (Table 4) nor the embryo quality (Tables 5 and 6). The kinetics of development during embryo culture was similar among the groups (Table 5). Moreover, the number of total cells and the percentage of apoptotic cells from the expanded blastocysts did not differ between the groups (Table 6).

Table 3. Embryo developmental stages on days 6, 7 and 8 of culture using ejaculated sperm selected in Percoll (EJ-P) and epididymal sperm (EP) selected in Percoll (EP-P), PureSperm (EP-PS) or washed in sp-TALP (EP-spTALP). Fertilization medium of all treatments was supplemented with 10 µg/mL of heparin.

| Treatment | Blastocyst D6 N (%) | | | | Blastocyst D7 N (%) | | | | Blastocyst D8 N (%) | | | | |
|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| | Bi | Bl | Bx | Total Embryos | Bi | Bl | Bx | Bn/Be | Total Embryos | Bl | Bx | Bn/Be | Total Embryos |
| EJ-P | 22 (37%) ^{a,b} | 20 (34%) ^a | 17 (29%) ^a | 59 | 7 (9%) ^a | 25 (31%) ^a | 44 (55%) ^b | 4 (5%) ^a | 80 | 15 (18%) ^a | 40 (49%) ^a | 27 (33%) ^a | 82 |
| EP-P | 20 (27%) ^b | 34 (47%) ^a | 19 (26%) ^a | 73 | 6 (6%) ^a | 32 (30%) ^a | 65 (61%) ^{a,b} | 3 (3%) ^a | 106 | 20 (18%) ^a | 56 (51%) ^a | 34 (31%) ^a | 110 |
| EP-spTALP | 23 (47%) ^a | 15 (31%) ^a | 11 (22%) ^a | 49 | 8 (12%) ^a | 19 (29%) ^a | 38 (58%) ^{a,b} | 1 (2%) ^a | 66 | 8 (12%) ^a | 41 (61%) ^a | 18 (27%) ^a | 67 |
| EP-PS | 26 (27%) ^b | 35 (36%) ^a | 35 (36%) ^a | 96 | 5 (5%) ^a | 24 (22%) ^a | 75 (70%) ^a | 3 (3%) ^a | 107 | 11 (10%) ^a | 65 (59%) ^a | 34 (31%) ^a | 110 |

a, b, c Means followed by different letters within each column differ between groups analyzed by chi-squared test ($P \leq 0.05$).

Embryo developmental stages: initial blastocyst (Bi), blastocyst (Bl), expanded blastocyst (Bx), hatching blastocyst (Bn) and hatched blastocyst (Be).

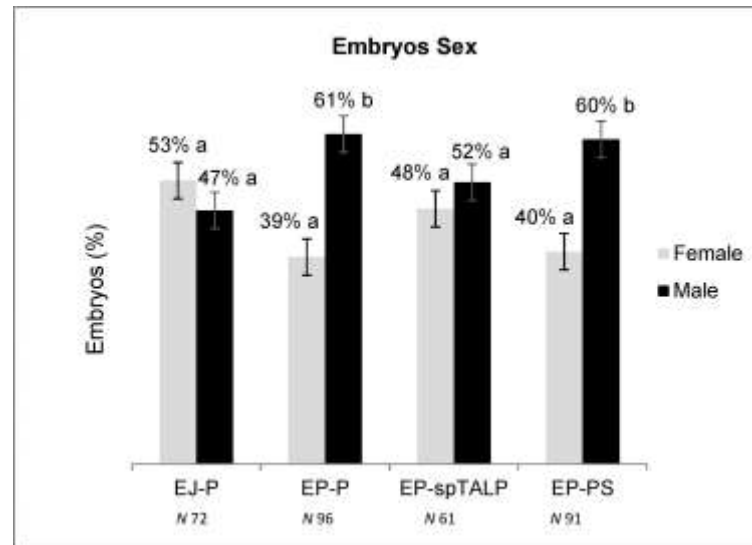


Fig 4. Percentage of male and female D8 embryos produced in vitro using ejaculate spermatozoa submitted to the Percoll selection (EJ-P) and epididymal sperm submitted to the Percoll (EP-P), PureSperm (EP-PS) and the wash with spTALP medium (EP-spTALP). ^{a, b} indicate difference between the proportion of male: female embryos within each group, analyzed by chi-squared test ($P \leq 0.05$).

Table 4. Cleavage on D2 and blastocyst rates on days 6 and 7 using ejaculated sperm (EJ-P) or epididymal sperm (EP) co-incubated with oocytes for 6, 12 and 18 h in fertilization medium supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of heparin.

| Treatments | N oocytes | Embryo Development | | |
|------------|-----------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | | Cleavage D2 N (%) | Blastocyst D6 N (%) | Blastocyst D7 N (%) |
| EJ 18h | 155 | 121 (78%) | 36 (23%) | 65 (42%) |
| EP 6h | 164 | 121 (74%) | 40 (24%) | 63 (38%) |
| EP 12h | 153 | 118 (77%) | 32 (21%) | 61 (40%) |
| EP 18h | 155 | 127 (82%) | 35 (23%) | 71 (46%) |

Values analyzed by chi-squared test. There was no difference between treatments ($P \leq 0.05$).

Table 5. Blastocysts developmental stages on days 6 and 7 of culture originated from oocytes co-incubated with ejaculated sperm (EJ 18h) per 18 hours and with epididymal sperm for 6, 12 and 18 h (EP 6h, EP 12h, EP 18h). Fertilization medium of all treatments was supplemented with 10 µg/mL of heparin.

| Treatment | Blastocyst D6 N (%) | | | | Blastocyst D7 N (%) | | | | |
|-----------|---------------------|----------|---------|---------------|---------------------|----------|----------|--------|---------------|
| | Bi | Bl | Bx | Total Embryos | Bi | Bl | Bx | Bn/Be | Total Embryos |
| EJ 18h | 9 (25%) | 23 (64%) | 4 (11%) | 36 | 6 (9%) | 26 (40%) | 33 (51%) | 0 (0%) | 65 |
| EP 6h | 14 (35%) | 20 (50%) | 6 (15%) | 40 | 3 (5%) | 24 (38%) | 34 (54%) | 2 (3%) | 63 |
| EP 12h | 13 (41%) | 16 (50%) | 3 (9%) | 32 | 8 (13%) | 20 (33%) | 29 (48%) | 4 (7%) | 61 |
| EP 18h | 11 (31%) | 22 (63%) | 2 (6%) | 35 | 6 (8%) | 30 (42%) | 34 (48%) | 1 (1%) | 71 |

Values analyzed by chi-squared test. There was no difference between treatments ($P \leq 0.05$). Embryo developmental stages: initial blastocyst (Bi), blastocyst (Bl), expanded blastocyst (Bx), hatching blastocyst (Bn) and hatched blastocyst (Be).

Table 6. Total cell number (mean \pm SD) and percentage of apoptotic cells (mean \pm SD) of day 7 embryos produced from oocytes co-incubated with ejaculated sperm for 18 hours (EJ 18h), and epididymal sperm for 6 (EP 6h), 12 (EP 12h) and 18 h (EP 18h).

| Treatment | N Embryos | Total cell number | Apoptotic cells |
|-----------|-----------|-------------------|------------------|
| | | | N (%) |
| EJ 18h | 29 | 158 \pm 47 | 7 \pm 4 (4.4%) |
| EP 6h | 31 | 174 \pm 45 | 7 \pm 3 (4.0%) |
| EP 12h | 26 | 164 \pm 45 | 7 \pm 4 (4.2%) |
| EP 18h | 31 | 173 \pm 43 | 7 \pm 4 (4.0%) |

Values analyzed by Tukey test. There was no difference between treatments ($P \leq 0.05$).

DISCUSSION

The recovery of EP sperm and its use in ARTs such as AI and IVP [1, 2, 3, 9, 15] has become a viable alternative to avoid the loss of genetic material of males that have accidentally died or have become infertile. However, the results obtained when these sperm cells are used in ARTs are inconsistent, which is probably due to lack of knowledge regarding their physiology and due to treating them in a similar manner as for the EJ. Therefore, aiming to establish the best protocol to use epididymal sperm in IVP, we evaluated their behavior in face of several factors that are involved in the preparation of sperm for its use in IVF.

Initially, we aimed to evaluate if the presence of heparin in the IVF medium would affect the physiological parameters of epididymal sperm. For this purpose, EP

sperm was incubated for 18 h in the presence or absence of heparin, and the sperm samples were evaluated at various time points during culture. The results showed that EP presented a higher resistance during incubation and maintained total motility, progressive motility, the percentage of cells with mitochondrial potential and stable membrane for a longer time than the EJ sperm. The higher stability of EP sperm post-thawing has been previously reported in other studies [8, 11,20]. However, the exposure of EP sperm to heparin altered their resistance, and the sperm exhibited a pattern of motility and viability similar to that observed for the EJ sperm.

One of the differences between EJ and EP is the exposure to seminal plasma, which contains various components, particularly proteins that bind to the plasma membrane and alter its permeability and stability. Therefore, the difference between the plasma-membrane compositions is possibly the factor responsible for the higher resistance of the EP sperm compared to EJ sperm.

The effect of heparin on EP-sperm resistance suggests that heparin has, through some mechanism, interacted and altered their physiology. It is well established that heparin interacts with seminal plasma proteins (BSPs) that bind to the epididymal spermatozoa when they are exposed to the seminal plasma in ejaculation [15, 21]. Heparin binding to BSPs induces loss of sperm surface components, which leads to the loss of cholesterol, phospholipids [22] and, finally, capacitation. Nevertheless, spermatozoa of the epididymis are not exposed to seminal plasma and, thus, do not have membrane-bound BSPs [22].

The absence of heparin receptors would not allow its interaction with EP; therefore, we were not expecting any effect of the heparin during the culture of epididymal sperm. Although the data clearly show that heparin induces changes in EP, the mechanisms and/or components involved in those changes are not known or described until now.

Conversely, in bovines, not only heparin but also other molecules are involved in capacitation events, such as high-density proteins, albumin and bicarbonate. Commonly, these components are present in the female reproductive tract or in an IVF medium [23]. Recent studies [24, 25] have reported the presence of other specific regions in the plasma membrane of porcine spermatozoa, in which different glycans can bind, allowing the sperm reservoir to be formed in the oviduct. Taking these results

into account, we can assume that heparin can interact, via some mechanism, with the EP sperm through other specific unknown regions, which could be involved in the sperm capacitation process.

Considering the effect of heparin on the viability and longevity of EP observed in the first experiment, we hypothesized that the presence of heparin would also affect the fertilization rate. The data showed that by 3 h of coincubation, regardless of the heparin presence, the EP sperm groups exhibited more fertilized oocytes than the EJ sperm groups. However, the effect of heparin on EP sperm was evident by 6 h of coincubation, when there was a considerable increase in the percentage of fertilized oocytes. This behavior was maintained until the end of the coincubation period. It is important to note that at 6 h, most of the oocytes of the EP sperm exposed to heparin were already fertilized and that additional coincubation time was not needed to obtain the maximum fertilization rate. In fact, additional coincubation time exhibited a detrimental effect on fertilization, because as the time increased, the polyspermy rates also increased. If we disregard the polyspermic oocytes, the fertilization rate obtained at 18 h was similar to that observed at 6 h.

Few studies have evaluated the effect of heparin on IVF using EP sperm. As observed in this study, Pavlok et al. [26] observed that a greater amount of fertilized structures when EP was used, including polyspermic structures. In contrast, a study by Stout [11] that evaluated the rate of fertilization of oocytes inseminated with EP sperm recovered from Holstein bulls showed that the presence of heparin did not affect the fertilization. However, it is important to point out that our fertilization data are in agreement with data from viability and longevity parameters, since it was shown in the first experiment that heparin affected the physiological characteristics of EP sperm. Thus, the greater the amount of spermatozoa available, the more rapidly fertilization occurred; if the coincubation was prolonged, an increase occurred in the rate of polyspermy.

After establishing the effects of heparin on EP sperm, the next step was to evaluate which sperm-selection procedure should be used. Next, the effect of two discontinuous gradients of selection and that of the washing procedure was evaluated on embryo production and quality. Our results showed that although the cleavage rate was similar, the blastocyst rate was higher when the sperm were selected via PS or P

than when they were washed in spTALP. Our results using EP were similar to those reported by other studies that used EJ sperm selected by different gradients [17, 27, 28, 29], which demonstrated that discontinuous gradients resulted in a better sperm population compared with sperm that was only subjected to a washing method.

Considering that discontinuous gradients such as P and PS are commonly used to obtain a high number of motile spermatozoa with more adequate fertilization function on EJ sperm, it could be expected that the same would occur for EP.

Considering that EP sperm presented some physiological differences from EJ sperm and that we were testing different discontinuous gradients to select the most suitable gradient to be used for IVP with EP sperm, the embryo sex ratio was also assessed. Surprisingly, a shift toward male embryos was observed when using EP sperm that were passed through P and PS gradients, which altered the sex ratio. The same results were not observed for the EJ that were selected using P and for EP that was only subjected to washing, since in both groups no difference from the expected 1:1 ratio was noted. These findings do not corroborate with that from other studies conducted by Martins et al. [3] and Vianna et al. [16] using EJ sperm, in which different discontinuous gradients have not affected the embryo sex ratio. One possibility for the contradictory results could be the effect of the sires, since effect of the bull on sex ratio has been demonstrated in several studies [22, 30, 31]. Nevertheless in the present study, the effect of an individual sire cannot be considered because the EP and EJ sperm used were obtained from the same animals, which leads to the supposition that the deviation may have resulted from the use of the discontinuous gradient. However, literature shows no evidence to support that discontinuous gradient can separate X and Y bearing sperm. Therefore, we cannot explain the sex ratio deviation observed in our results. Additional studies are needed to clarify it.

Finally, to confirm that IVF with EP can last only 6 h without compromising embryo development, we evaluated blastocyst production and quality using different times for IVF. In this experiment, we chose to use PS as the sperm selection method. The reason to do this was, first, because no differences were found in any of the studied parameters between the two gradient methods, and, second, because P has been previously described [32] as toxic, and thus the tendency is to exclude it from embryo production systems in the future. The blastocyst rate at D7, total cell number and

percentage of apoptotic cells were similar if we used either 6 or 18 h of coincubation.

Therefore, the results confirmed that only 6 h are needed for IVF when EP sperm selected with PS is used. It has been shown that for EJ sperm, at least 12 h of coincubation is needed to reach the maximum fertilization rate [19], and this period can be extended to 18 h without affecting the embryonic quality or the polyspermy rate. However, to our knowledge, different coincubation times using EP sperm have not yet been evaluated, and the available studies that used EP sperm in embryo production used the same protocol that has been commonly used for EJ sperm. It is possible that differences in plasma membrane components, such as absence of seminal plasma and the coat proteins, or less quantity of cholesterol may be responsible for the difference in behavior of EP sperm in IVF procedures.

In conclusion, the presence of heparin in the IVF medium induces an acceleration in the fertilizing ability of EP sperm. Therefore, the time of coincubation during IVF can be reduced to 6 h, without affecting embryo production and quality. In addition, the highest rates of embryo production are obtained by selecting EP sperm with PS or P; however, both gradients altered the sex ratio, producing a greater quantity of male embryos.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and ethic committee approval of animal procedures

Unless otherwise indicated, the reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All procedures with animals were approved by the Ethics Committee of Embrapa's Animal Genetic Resources and Biotechnology (Protocol CEUA–Cenargen 004/2013).

Animals

Seven Gir bulls (*Bos taurus indicus*) aged between 36 and 40 months were selected, and used for EP and EJ sperm recovery. The animals belonged to an Embrapa's experimental herd. During the experiment at the farm, the animals were raised in an extensive system and fed pasture (*Brachiara brizantha*), mineral salt and water ad libitum. Prior to the experiment, the bulls were subjected to three andrological evaluations, and only sires that showed a subjective total sperm motility $\geq 70\%$ and a minimum of 70% morphologically normal sperm were used.

Approximately six months after the end of the experiment animals were sold in an internal auction of the company.

Sperm collection and cryopreservation

Sperm samples were collected from ejaculated and epididymal of the same animal, according to the method described by Cunha et al. [8]. Briefly, one ejaculate was collected via electroejaculation from each Gir bull. Seven to fifteen days after semen collection, all sires were orchietomized. The testes were cleaned with saline solution (NaCl 0.9%) and 70% alcohol, and sperm collection from the cauda epididymis was performed [8]. Each epididymis was thoroughly cleaned, and the superficial blood vessels of the tail were punctured so that most of the blood could be wiped off. Next, the sperm from the epididymis tail were collected by means of cut administered with a scalpel and removal of the white fluid coming out from the cut tubules with the aid of a blade [33].

After recovery, the EJ or EP were diluted in Tris citrate-yolk-glycerol Dilutris extender (SEMENCON–Agricultural Products Ltd., Porto Alegre, RS, Brazil), loaded at a concentration of 25 to 30 × 10⁶ sperm/straw (0.25 mL) and cryopreserved [8].

Orchiectomy procedures

Seven to fifteen days after semen collection the bulls were castrated. First, the animals received sedation and analgesia by using xylazine (0.08 mg/kg) intravenously administered. The local anesthesia was performed using chlorhydrate of lidocaine (1000g/kg) without vasoconstrictor, into each spermatic cord and along the incision line of each testicle. A horizontal incision was made and testicles were completely exposed, then, spermatic cord was liberated from the tunica vaginalis and with a sterile lines of nylon, the spermatic cords were ligated and the surgical procedure for completely remove of testis, with the use of a scalpel, was performed.

Immediately after the removal, an antiseptic solution and repellent spray were applied. After surgical procedures, animals received by intramuscular way flunixin meglumine (1.5 mg/kg) twice a day, for 3 days. A local curative was made daily, per approximately ten days once a day, or until the scrotum incision presented normal conditions of healing,

without abnormal secretions.

Sperm quality assessments

Motility analysis: The percentages of total and progressive motility were evaluated by the IVOS 12.3 Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA) system (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA). For analysis, a setup was previously adjusted for bovine spermatozoon, according to the manufacturer's instructions. For evaluation, 8 μ L of sperm was loaded into a prewarmed Makler chamber (Makler, Santa Ana, CA, USA). At least three fields were selected manually for reading and analysis.

Flow cytometry assessments: Evaluations were performed by flow cytometry on an AMNIS FlowSight Image Cytometer (Amnis Corp., Seattle, WA) using the INSPIRE V6.1 acquisition software. Fluorescent dyes were excited by lasers at 488 nm at 10 mW and 405 nm at 30 mW. The signals emitted by the green probes were collected in Channel 2 (505–560 nm); those emitted by the red probes were collected in Channel 4 (595–642 nm); and the blue signals were collected in Channel 7 (435–505 nm). A specific acquisition template was previously created for identifying and acquiring only sperm cells. Thus, 10,000 events were collected per sample/parameter evaluated. For analysis of the results, dot plot graphs or histograms were created from unstained control samples, and the populations were gated based on stain patterns. According to the manufacturer's instructions and recommendations, a compensation matrix was used for all evaluations that were composed of more than one fluorescent dye, and a complete calibration of the equipment was performed each time that the system was turned off.

Plasma membrane integrity and apoptosis were evaluated using an apoptosis detection kit (Alexa Fluor 488 Annexin-V/Dead Cell Apoptosis—Molecular Probes, Eugene, OR, USA) that contained Annexin-V conjugated with Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide (PI) solution. Sperm were classified as follows: alive (PI and Annexin-V negative), necrotic (PI positive) and apoptotic (Annexin-V positive or double positive for Annexin-V and PI).

Acrosome status was assessed using fluorescein isothiocyanate conjugated with peanut agglutinin (FITC-PNA, Invitrogen, Eugene, USA) and PI (Molecular Probes, Eugene,

USA) as previously described [34], with modifications. The work solution for staining consisted of 100 μL of sodium citrate (3% diluted in NaCl 0.9%), 1 μL of PI (0.5 mg/mL), and 1.5 μL of FITC-PNA solution (1 mg/mL in PBS). PI-negative sperm were considered alive, and PI-positive sperm were considered dead. Alive or dead cells were classified as acrosome-reacted (FITC-PNA positive) or as acrosome-intact (FITC-PNA negative).

The mitochondrial membrane potential was determined using MitoTracker Green (MTGreen; Molecular Probes), as described by Celeghini et al. [35]. The work solution for staining consisted of 100 μL of sodium citrate (3% diluted in NaCl 0.9%) and 0.25 μL of MTGreen (1 mM). Sperm that were MTGreen-positive at the midpiece were considered to exhibit a positive mitochondrial potential, sperm in which MTGreen staining was absent on the midpiece were considered to be lacking a mitochondrial potential.

Stability of the plasma membrane was assessed according to the method described by Hallap et al. [36]. For this evaluation, Merocyanine 540 (M540)/YoPro1 (Molecular Probes) was used. The work solution for staining was composed of 5 mL of sodium citrate (3% diluted in NaCl 0.9%), 2.6 μL of M540 (1 mM in DMSO) and 1 μL of YoPro1 (25 μM). Cells that were M540-negative and YoPro1-positive or YoPro1-negative were considered as possessing stable sperm membranes. Cells that were M540-positive and YoPro1-positive or YoPro1-negative were considered as possessing unstable sperm membranes. To differentiate sperm cells from other events, all probes used in these assessments contained Hoechst 33342 (bisBenzimide H33342 trihydrochloride) at a concentration of 5 mg/mL (PBS), according to Hallap et al. [36].

Assessment of fertilization and embryo production

Oocyte collection and in vitro maturation: Ovaries from crossbred cows (*Bos indicus* x *Bos taurus*) were collected immediately after slaughter and transported to the laboratory in saline solution (NaCl 0.9%) supplemented with penicillin G (100 IU/mL) and streptomycin sulfate (100 mg/mL) at 35°C. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 to 8 mm diameter follicles with an 18-gauge needle; only COCs containing homogeneous cytoplasm and more than three compact layers of cumulus cells were used [37].

After selection, the COCs were transferred into a 200 μ L drop of maturation medium under silicone oil. The maturation medium consisted of TCM -199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.01 IU/mL of porcine FSH, 0.1 mg/ mL L-glutamine and antibiotic (amikacin, 0.075 mg/mL). The COCs were incubated for 22 to 24 h at 39°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air.

In vitro fertilization and embryo culture: Following maturation, the COCs were transferred into a drop of fertilization medium, which consisted of Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) [38] supplemented with penicillamine (2 mM), hypotaurine (1 mM) epinephrine (250 mM) and heparin (10 μ g/mL). For fertilization, a pool of frozen EJ (always used as control group) or EP from the 7 bulls were used.

Sperm samples were selected by a P (Pharmacia, Freiburg, Germany) 45–90% gradient [39], PS (Nidacon Intl. AB, Gothenburg, Sweden) 40–80% gradient [9] or washing in 1 mL of spTALP medium [19]. SpTALP medium was composed of 99 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.35 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 21.6 mM sodium lactate, 1 mg/mL sodium pyruvate, 6 mg/mL BSA, and 1 mg/mL gentamicin (pH 7.4). The samples for both gradient methods were prepared in microtubes in a total volume of 800 μ L [39]. After gradient selection, the samples were washed by centrifugation (300 \times g per 5 min) in spTALP medium. After selection, the sperm concentration was determined using a hemocytometer, and a final concentration of 1×10^6 sperm/mL was added to fertilization drops containing the COCs. Spermatozoa and oocytes were coincubated at 39°C under 5% of CO₂ in air.

Fertilization rate and embryo development: To evaluate the fertilization rate, presumptive zygotes were removed from fertilization medium at 3, 6, 12 and 18 h after insemination. Next, the zygotes were denuded, fixed in acetic acid:alcohol (1:3) and stained with 1% lacmoid solution in 45% glacial acetic acid. After staining, the zygotes were examined under a phase contrast microscope (Nikon Eclipse E200, 1000X) and classified as follows: (a) non-fertilized— presence of female and absence of male chromatin or (b) fertilized—presence of female and male chromatin in the cytoplasm, as well as a decondensed sperm head, pronuclei or cleavage. Polyspermic sperm, in which the cytoplasm contains female chromatin and two or more sperm or more than two pronuclei, were included in the fertilized group.

For embryo development, after fertilization, the presumptive zygotes were

washed and transferred to a 200 μ L drop of SOFaaci medium [40] supplemented with 2.77 mM myo-inositol and 5% FBS. The zygotes were cultured at 39°C under 5% CO₂ in air for 7 or 8 days. The embryos were evaluated on Day 2 (D2) postinsemination for cleavage and on Days 6 (D6), 7 (D7) and 8 (D8) for the blastocyst rate.

Embryo quality assessments: To evaluate the embryo quality, the parameters used were the developmental kinetics, the total cell number and the percentage of apoptotic cells. The developmental kinetics/speed of development was assessed from the stages of embryo development on D6, D7 and D8. On D8, the embryos were stored for sex analysis. To determine the total number and percentage of apoptotic cells of D7 expanded blastocysts, a Click-iT TUNEL Alexa Fluor Thermo Fisher Kit (Waltham, MA, USA) was used.

The embryos were washed in PBS supplemented with polyvinyl pyrrolidone (PVP) (1 mg/mL) and were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 15 min. A second wash in 1 mg/mL PVP was performed, and the blastocysts were incubated in 0.5% Triton-X for 20 min. After the permeabilization procedure, the embryos were exposed to the TUNEL and Alexa Fluor 488 mix for 1 h at 37°C and treated with H33342 for 10 min. Finally, the embryos were washed in PVP and placed on slides for analysis under a fluorescence microscope. The excitation wavelength filters used for visualization were 495/519 nm for Alexa Fluor 488 and 350/461 nm for H33342. For each blastocyst, the total number of cells (blue nuclei, H33342) and apoptotic cells (green nuclei, TUNEL) were determined, and the percentage of apoptotic cells was determined.

Embryo sexing procedure: After culture, the embryos were stored at -20 C° in a lysis solution for sexing assessment. Sexing evaluation procedures was performed by polymerase chain reaction (PCR) using two pair of primers (Ludwing) adapted from the protocol described by Sousa et al. [41]. The first primer was specific to a region of the Y chromosome, and the second pair was specific to a bovine autosomal gene. Initially, the embryos were exposed for 5 min at 50°C in lysis solution and PCR buffer 1X that contained 15 μ g of proteinase K (Invitrogen) in a final volume of 10 μ L. Proteinase K inactivation was performed at 95°C for 5 min.

The PCR procedure was performed by mixing solutions containing 50 nM bovine autosomal primer and 75 nM Y chromosome primer, 200 μ M dNTP, 1X PCR buffer and 1 U of Taq Polymerase Platinum (Invitrogen), to obtain a final volume of 30 μ L for each individual sample. A male and female control sample, which had been previously

tested and used in other assays in our laboratory, were used. The PCR program consisted of heating at 94°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 30 sec, 57°C for 40 sec and 72°C for 40 sec and completing primer extension at 72°C for 3 min. The products were visualized on a 1.5% agarose gel via staining with ethidium bromide (10 mg/mL) under ultraviolet light. When two amplicons were detected (280 and 210 base pairs), the embryo was identified as male, whereas detection of one amplicon (280 base pairs) indicated a female embryo.

Experimental design

1- Effect of heparin on viability and longevity of epididymal sperm

To determine if supplementation of fertilization medium with heparin would affect the post- thawing longevity and viability of epididymal sperm, the EJ and EP groups were used. All bulls were used in all groups, in a factorial design. The samples of all animals were individually analyzed, and each animal was considered a biological replicate. Each sample was composed of a pool formed by four straws from each animal/group; this procedure was necessary to have a sufficient amount of cells for cytometry and CASA assessments. Straws were thawed, pooled, subjected to a P 45–90% gradient and adjusted to a final concentration of 2×10^6 sperm/mL in a final volume of 400 μ L of fertilization medium with or without heparin supplementation. EP and EJ sperm were distributed into three groups: 1) EJ +: EJ incubated in fertilization media; 2) EP +: EP incubated in fertilization media and 3) EP -: EP incubated in fertilization media without heparin. The samples were maintained at 39°C under a 5% CO₂ atmosphere for 18 h.

Assessments were performed at 0 h and after 3, 6, 12 and 18 h. At each time point, a sample from each group was removed from the incubator and was used to assess total and progressive motility, acrosome integrity, apoptosis, necrosis, plasma membrane integrity, membrane stability and mitochondrial potential.

2- Effect of heparin on fertilization rate

To evaluate if the presence of heparin in the fertilization medium would affect the ability of EP to fertilize the oocytes, they were coincubated for different periods of time

during IVF. To minimize the bull effect, EP and EJ sperm used in this experiment was obtained from pooling one straw from each of the seven bulls. After pooling the straws, motile sperm from each group (EJ and EP) were selected by centrifugation through a 45–90% discontinuous P gradient, as described above.

A total of 829 oocytes were used in a seven-replicate experiment. In each replicate, the oocytes were distributed into three treatments: 1) EJ+H: oocytes were coincubated with EJ sperm in fertilization medium supplemented with heparin; 2) EP+H: oocytes were coincubated with EP sperm in fertilization medium that was supplemented with heparin; 3) EP-H: oocytes were coincubated with EP sperm in fertilization medium without heparin. At 3, 6, 12 and 18 h postinsemination, the oocytes were denuded and fixed to assess the fertilization rate.

3- Effect of the epididymis-sperm selection method on in vitro embryo production and embryo sex

The aim of this experiment was to assess if the sperm-selection method could affect not only embryo production but also the sex ratio of the produced embryos. Based on the results obtained from the second experiment, heparin was included in the fertilization medium for all treatments. Three different methods of sperm preparation for IVF were evaluated. A total of 759 COCs were used in a four-replicate experiment.

Oocytes were fertilized with a pool composed of EP or EJ sperm obtained from the same seven sires used in the previous experiments. Treatments were defined as follows: 1) EJ-P: oocytes were coincubated with EJ sperm that were subjected to P gradient selection; 2) EP-P: oocytes were coincubated with EP sperm selected by a P gradient; 3) EP wash: oocytes were coincubated with EP sperm washed in spTALP medium; 4) EP-PS: oocytes were coincubated with EP sperm selected by a PS gradient. The cleavage, blastocyst rates and kinetics of embryo development were assessed at D2, D6, D7 and D8. On D8, the embryos were classified and stored until used for sexing analysis procedures.

4- Effect of sperm-oocyte coincubation time on embryo production

To confirm that 6 h of coincubation (experiment 2) would not affect embryo

production, a total of 627 oocytes were used in a five-replicate experiment. Four treatments were used: 1) EJ 18h: oocytes were coincubated with EJ sperm for 18 h; 2) EP 6 h: oocytes were coincubated with EP sperm for 6 h; 3) EP 12 h: oocytes were coincubated with EP sperm for 12 h and 4) EP 18 h: oocytes were coincubated with EP sperm for 18 h. For all groups, the IVF medium was supplemented with heparin, and sperm selection was performed using the PS discontinuous gradient. Cleavage and blastocyst rates were assessed on D2, D6 and D7. On D7, expanded blastocysts were stored for TUNEL analysis.

Statistical analysis

Data of sperm viability/longevity and CASA sperm motion variables were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer multiple comparison tests using SAS version 9.4 (SAS virtual University Edition). Analyses considered the main effects of group (EJ+, EP+, and EP-), time (hours 0, 3, 6, 12, and 18), and their interactions. The SAS MIXED procedure with a REPEATED statement was used to account for the autocorrelation between sequential measurements. Fertilization and embryo and sex rates were compared by the chi- squared test and TUNEL data by the Tukey test; for both analyses, the Prophet 5.0 statistical package (BBN Systems and Biotechnology, 1997, USA) was used. For all results, a level of 5% ($P \leq 0.05$) was considered significant.

REFERENCES

- 1- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, et al. (2005) Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63: 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.003> PMID: 15589271
- 2- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, et al. (2003) Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60: 1249–1259. PMID: 14511779
- 3- Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MAN (2007) Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal reproduction science* 101: 326– 331. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.018> PMID: 17336472
- 4- Chaveiro A, Cerqueira C, Silva J, Franco J, Silva MS (2015) Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iranian journal of veterinary research* 16: 188–193.
- 5- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ (2006) Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of andrology* 27: 201–211. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05089> PMID: 16278371

- 6- Juyena NS, Stelletta C (2012) Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of andrology* 33: 536–551. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583> PMID: 22016346
- 7- Gwathmey TM, Igotz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS (2006) Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of reproduction* 75: 501–507. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053306> PMID: 16790686
- 8- Cunha ATM, Carvalho JO, Kussano NR, Martins CF, Mourao GB, et al. (2016) Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology* 73: 348– 355. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.170> PMID: 27693236
- 9- Bertol MA, Weiss RR, Kozicki LE, Abreu AC, Pereira JF, et al. (2016) In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 degrees C-20 degrees C). *Theriogenology* 86: 1014–1021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.030> PMID: 27156681
- 10- Fraser LR, Drury LM (1976) Effect of removal of epididymal secretions on fertilization in vitro of mouse eggs. *Journal reproduction fertility*. 48: 125–128.
- 11- Stout MA (2012) Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls. Louisiana: University of Louisiana. 203 p.
- 12- Krishnakumar S, Whiteside DP, Elkin B, Thundathil JC (2011) Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 76: 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.001> PMID: 21550101
- 13- Matas C, Sansegundo M, Ruiz S, Garcia-Vazquez FA, Gadea J, et al. (2010) Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74: 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.002> PMID: 20688369
- 14- Martins CF, Driessen K, Costa PM, Carvalho JO, de Sousa RV, et al. (2009) Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. *Animal reproduction science* 116: 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.018> PMID: 19181463
- 15- Rodriguez-Villamil P, Hoyos-Marulanda V, Martins JA, Oliveira AN, Aguiar LH, et al. (2016) Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology* 85: 540–554. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.044> PMID: 26553567
- 16- Vianna LL, Pradieé J, Santos ECS, Gonçalves AO, Pfeifer LFM, et al. (2014) Isolate and Optiprep mini- gradients as alternatives for sperm selection in bovine in vitro embryo production. *Canadian journal of animal science* 94: 35–42.
- 17- Mendes JOB, Burns PD, De La Torre-Sanchez JF, Seidel GE (2003) Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60: 331– 340. PMID: 12749946
- 18- Hossepian de Lima VFM, Moreira-Filho CA, Lucio AC, Resende MV (2011) Sexagem de

espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. *Revista brasileira de zootecnia* 40: 1680–1685.

19- Dode MAN, Rodvalho NC, Ueno VG, Fernandes CE (2002) The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. *Animal reproduction science* 69: 15–23. PMID: 11755713

20- Cummins JM (1976) Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. *Journal of experimental zoology* 197: 183–190. PMID: 965907

21- Gwathmey TM, Igotz GG, Suarez SS (2003) PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of reproduction* 69: 809–815. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010827> PMID: 12748117

22- Parrish JJ (2014) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81: 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005> PMID: 24274411

23- Thérien I, Moreau R, Manjunath P (1998) Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of reproduction* 59: 768–776. PMID: 9746724

24- Silva E, Kadirvel G, Jiang R, Bovin N, Miller D (2014) Multiple proteins from ejaculated and epididymal porcine spermatozoa bind glycan motifs found in the oviduct. *Andrology* 2: 763–771. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00249.x> PMID: 25079898

25- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, et al. (2012) Porcine sperm bind to specific 6- sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biology of reproduction* 87: 147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.103879> PMID: 23115267.

26- Pavlok A, Torner H, Motlik J, Fulka P, Kauffold P, et al. (1988) Fertilization of bovine oocytes in vitro: Effect of different sources of gametes on fertilization rate and frequency of fertilization anomalies. *Animal reproduction science* 16: 207–213.

27- Buranaamnuay K, Sangsuwan P, Changsangfa C, Faisaikarm T, Kaeoket K (2014) Influence of Discontinuous PureSperm and OptiPrep Gradient Centrifugations on Bovine Sperm Quality and the Sex Ratio of in vitro Produced Embryos. *Chiang mai journal of science* 41: 1–12.

28- Sepúlveda B, Arias ME, Aguila L, Zambrano F, Sánchez R, et al. (2017) Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *International journal of andrology* e12921: 1–7.

29- Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R (2017) Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive biology* 226:1–7.

30- An LY, Chaubal SA, Liu Y, Nedambale TL, Xu J, et al. (2017) Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed in vitro fertilization. *Journal of reproduction and development* 63: 175–183.

31- Demyda-Peyrás S, Dorado J, Hidalgo M, Moreno-Millán M (2013) Influence of sperm fertilising concentration, sperm selection method and sperm capacitation procedure on the

incidence of numerical chromosomal abnormalities in IVF early bovine embryos. *Reproduction fertility and development* 27: 351–359.

32- De Vos A, Nagy ZP, Van De Velde H, Joris H, Bocken G, et al. (1997) Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* 12: 1980–1984. PMID: 9363717

33- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, et al. (2006) Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65: 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045> PMID: 15996726

34- Klinc P, Rath D (2007) Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in domestic animals* 42: 63–67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00730.x> PMID: 17214776

35- Celeghini EC, de Arruda RP, de Andrade AF, Nascimento J, Raphael CF (2007) Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in domestic animals* 42: 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x> PMID: 17845603

36- Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2006) Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology* 65: 1122–1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.009> PMID: 16182357

37- Boni R (2012) Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Animal reproduction* 9: 333–340.

38- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859–869. PMID: 16727781

39- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, et al. (2009) Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71: 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002> PMID: 19230963

40- Holm P (1988) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* 50: 1285–1299.

41- Sousa RV, Silva CCR, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R, et al. (2017) Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* 90: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.003> PMID: 28166976

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2

FORMA E TAMANHO DE ESPERMATOZOIDES DO EPIDÍDIMO DE TOUROS GIR AVALIADOS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA: UMA CARACTERIZAÇÃO EM NANOESCALA

Cunha, A.T.M¹; Silva, L.P^{1,2}; Carvalho, J.O³; Dode, M.A.N^{1,4}.

- 1- Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;
- 2- Laboratório de Nanobiotecnologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil;
- 3- Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Espírito Santo, Alegre, Brasil;
- 4- Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

RESUMO EXPANDIDO

RESUMO

Os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (EP) são células fisiologicamente distintas quando comparadas a espermatozoides do ejaculado (EJ) devido à não terem sido expostas ao plasma seminal. Portanto, é possível que a morfologia de EP também seja diferente dos do EJ. O objetivo deste estudo foi caracterizar morfologicamente a cabeça de EP, e avaliar se as diferenças fisiológicas entre EP e EJ também são expressas na morfologia. EP e EJ foram recuperados de sete touros Gir e avaliados individualmente. Um total de 140 espermatozoides criopreservados foram analisados por cada grupo, utilizando a microscopia de força atômica (MFA). As imagens foram adquiridas através do modo contato (SPM-9600 - Shimadzu, Japão). Em seguida, o software off-line SPM-9600 foi utilizado para a segmentação manual das cabeças, através do zoom digital das imagens originais. Vinte e quatro características estruturais foram avaliadas, incluindo 12 parâmetros uni, bi e tri dimensionais, além de 12 descritores de forma que foram calculados a partir dos parâmetros uni e bi dimensionais. Os dados foram analisados pelo T teste ($P \leq 0,05$), e foram também submetidos a análise de componentes principais (ACP). Os descritores de forma mostraram que o grupo EP apresentou maior rugosidade e alongação, e menor fator de forma e taxa de circularidade ($P \leq 0,05$) do que o grupo EJ. Para os demais parâmetros, não foram observadas diferença estatística. A ACP não distinguiu os grupos, os quais foram distribuídos de forma semelhante. Os resultados obtidos neste estudo mostram que EP e EJ coletados dos mesmos touros são morfologicamente semelhantes em 19 dos 24 parâmetros avaliados, indicando que a ausência de plasma seminal não afeta a morfologia de EP.

Palavras-chave: cabeça do espermatozoide; morfologia; bovinos.

INTRODUÇÃO

Após deixarem os túbulos seminíferos dos testículos, os espermatozoides são transportados para o epidídimo, onde ocorre a maturação. O processo de maturação abrange modificações morfológicas e fisiológicas necessárias para que os espermatozoides adquiram a capacidade de fecundação. Essas modificações incluem mudanças no perfil bioquímico da membrana plasmática, condensação final da cromatina, trânsito das gotas

citoplasmáticas e aquisição da motilidade (Cornwall, 2009; Dacheux e Dacheux, 2014; Gervasi e Visconti, 2017).

Após passarem pelo epidídimo, os espermatozoides maturados são armazenados na cauda do epidídimo, onde permanecem até a ejaculação. Na ejaculação os espermatozoides se misturam com o plasma seminal e são revestidos por seus componentes, incluindo a família de proteínas de ligação a heparina, conhecidas como *Binder sperm proteins* (BSPs). O revestimento fornecido pelo plasma seminal está relacionado a importantes eventos como o aumento da estabilidade da membrana plasmática, formação do reservatório no istmo, formação de sítios específicos de membrana para a ligação da heparina, capacitação e ligação dos espermatozoides à zona pelúcida (Miller *et al.*, 1990; Thérien *et al.*, 1998; Manjunath e Thérien, 2002; Gwathmey *et al.*, 2006; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016).

Considerando que os EP não são expostos ao plasma seminal, eles são fisiologicamente diferentes dos espermatozoides do ejaculado (EJ) (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016). De fato, estudos tem mostrado que diferenças entre EP e EJ em relação à maior resistência dos EP à refrigeração, maior longevidade pós-descongelamento, além de serem capaz de se ligar ao istmo com a mesma eficiência que EJ, em ensaios in vitro (Cunha *et al.*, 2016). Achados mais recentes usando a tecnologia in vitro, sugerem que os EP respondem à suplementação de heparina (Cunha *et al.*, 2019) e requerem menos tempo para capacitação in vitro (Matas *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2019). Essas diferenças fisiológicas, sugerem que a morfologia dos EP também seja diferente. Essa hipótese também foi levantada por outro estudo utilizando EP de outras espécies (Esteso *et al.*, 2006).

Entretanto, a maioria dos relatos que estuda a caracterização de espermatozoides fazem uso de protocolos que utilizam corantes, e muitas vezes as dimensões estruturais são determinadas manualmente, o que pode subestimar possíveis particularidades. De fato, estudos utilizando espermatozoides de coelhos (Ierardi *et al.*, 2008) mostraram que os detalhes mais precisos da estrutura dos espermatozoides não puderam ser detectados por métodos manuais que oferecem resolução limitada. Uma alternativa para avaliar a morfologia com mais precisão é através do uso da microscopia de força atômica (MFA), que representa uma ferramenta eficaz para analisar topograficamente a superfície de amostras biológicas ou não biológicas, com resolução em nanoescala. A MFA tem sido utilizada para estudos da célula espermática envolvendo a organização da membrana plasmática (Jones *et al.*, 2007; Whited e Park, 2014), caracterização espermática (Ierardi *et al.*, 2008),

investigação precisa de defeitos morfológicos (Saeki *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018) e interação de estruturas extracelulares com proteínas de membrana (Barboza *et al.*, 2004; Whited e Park, 2014). No entanto, não existem relatos em que EP e EJ recuperados do mesmo animal sejam comparados utilizando MFA.

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfológicamente os EP e comparar sua morfologia com EJ, recuperados dos mesmos reprodutores, utilizando a MFA como ferramenta.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foram utilizadas amostras de sêmen de sete touros da raça Gir, previamente utilizadas em outros estudos (Cunha *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2019). As amostras de sêmen foram coletadas do EJ e da cauda do epidídimo do mesmo animal, em seguida foram criopreservadas de acordo com o método descrito por Cunha *et al.* (2016). Brevemente, os EJ foram coletados através de eletroestimulação e sete a 15 dias após a coleta do sêmen os touros foram orquiectomizados para a recuperação de EP.

Para as análises microscópicas dois grupos foram formados: EP e EJ. Uma palheta de cada animal foi descongelada para cada grupo, avaliada individualmente e considerada uma réplica biológica.

Após o descongelamento foi retirado uma amostra de cada grupo para avaliação da integridade acrossomal em citometria de fluxo, utilizando isotiocianato de fluoresceína conjugado com aglutinina de amendoim (FITC-PNA – Invitrogen, Eugene, EUA) e iodeto de propídio (IP – Molecular Probes, Eugen, EUA) conforme descrito por Cunha *et al.* (2019).

Para as análises em MFA, as amostras foram previamente lavadas e fixadas de acordo com Carvalho *et al.* (2013). As imagens foram adquiridas através do microscópio SPM-9600 (Shimadzu, Japan), operando em modo contato, utilizando 200 μm de comprimento com *V cantilevers* (constante de $\sim 0,15$ N/m, frequência de ressonância 24kHz) com ponteira piramidal integrada (raio de curvatura < 20 nm). A extensão de 100 μm foi usada para a varredura seguindo a direção XY e 7 μm na direção Z. A aquisição das imagens foi realizada em 512×512 pixels e taxa de varredura de 1Hz (Bonatto *et al.*, 2009).

As imagens obtidas foram processadas utilizando o software off-line SPM-9600. Inicialmente, todas as imagens foram submetidas a um ajuste automático de nivelamento da superfície, em seguida foram manualmente segmentadas, utilizando um zoom digital da imagem original para a análise individual das cabeças dos espermatozoides. Desta forma, foram analisadas medidas uni, bi e tri dimensionais da cabeça dos espermatozoides, em seguida, utilizando as medidas uni e bi e tri dimensionais, descritores de formas foram gerados a partir de fórmulas matemáticas, previamente relatadas por Carvalho et al. (2013) e descritas abaixo:

Fator de forma: $(4 \times \pi \times \text{Área excluindo orifícios})/(\text{Perímetro} \times \text{Perímetro})$;
 Circularidade: $(4 \times \text{Área incluindo orifícios})/\pi \times (\text{Diâmetro máximo} \times \text{Diâmetro máximo})$;
 Taxa de aspecto: $\text{Diâmetro máximo}/\text{largura}$; Diâmetro efetivo: $(\text{Área incluindo orifícios}/\pi) \times 2$; Grau de circularidade: $\pi \times \text{Diâmetro máximo}/4 \times \text{Área excluindo orifícios}$; Taxa de circularidade: $(4 \times \pi \times \text{Área incluindo orifícios})/\text{Perímetro} \times \text{Perímetro}$; Grau de fineza: $\text{Diâmetro máximo}/\text{largura}$; Taxa de compactação: $(\sqrt{4/\pi}) \times \text{Área incluindo orifícios})/\text{Diâmetro máximo}$; Elongação: $(\text{Perímetro} \times \text{Perímetro})/\text{Área incluindo orifícios}$; Rugosidade: $(\text{Perímetro} \times \text{Perímetro})/(4 \times \pi \times \text{Área excluindo orifícios})$.

Para cada animal, um total de 20 espermatozoides foram mensurados e individualmente analisados quanto a 24 características, totalizando 140 células analisadas por grupo.

Os dados obtidos a partir das características uni, bi e tri dimensionais, incluindo também a integridade acrossomal e os descritores de forma, foram comparados através do T teste ($P < 0,05$), apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Além das análises individuais, os 24 parâmetros obtidos foram avaliados coletivamente utilizando um modelo de análise dos componentes principais (ACP). Todos os dados foram analisados através do software Past3.

RESULTADOS

Para evitar a interferência da presença do acrossoma no volume da cabeça do espermatozoide, uma amostra de cada grupo foi removida para a avaliação da integridade acrossomal. Não foram detectadas diferenças na porcentagem de células com acrossoma reagido entre os grupos EP (18,07%) e EJ (22,15%).

Os valores obtidos através dos parâmetros uni, bi e tri dimensionais são mostrados na Tabela 1, as medidas analisadas para EJ e EP foram semelhantes entre os dois grupos.

Tabela 1. Valores \pm (DP) de medidas uni, bi e tri dimensionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) avaliados por microscopia de força atômica.

| Medidas de estruturas uni dimensionais | | | | | | | |
|---|--|---|---|---|--|---|---|
| Grupo | Raio médio (μm) | Variância de raio médio (μm) | Altura máxima (μm) | Altura mínima (μm) | Altura média (μm) | Diâmetro Máximo (μm) | Largura (μm) |
| EJ | 4,21 \pm 0,14 | 1,13 \pm 0,06 | 0,52 \pm 0,03 | 0,16 \pm 0,02 | 0,31 \pm 0,04 | 12,13 \pm 0,49 | 9,32 \pm 1,11 |
| EP | 4,14 \pm 0,13 | 1,11 \pm 0,08 | 0,48 \pm 0,05 | 0,16 \pm 0,02 | 0,29 \pm 0,04 | 11,69 \pm 0,4 | 7,69 \pm 0,58 |

| Medidas de estruturas bi e tri dimensionais | | | | | |
|--|---|---|--|--|--|
| Grupo | Perímetro (μm) | Perímetro C (μm) | Área incluindo orifícios (μm^2) | Área de superfície (μm^2) | Volume (μm^3) |
| EJ | 30,9 \pm 1,2 | 28,4 \pm 1,3 | 49,6 \pm 2,9 | 50,4 \pm 2,9 | 15,9 \pm 2,2 |
| EP | 31,1 \pm 1,3 | 28,2 \pm 1,0 | 47,9 \pm 3,2 | 48,8 \pm 3,4 | 15,6 \pm 2,3 |

Valores obtidos pela média \pm desvio padrão de 140 espermatozoides por grupo.

Não houve diferença entre os grupos analisados ($P > 0,05$).

Os descritores de forma (Tabela 2) mostram que o grupo EP apresentou maior rugosidade e alongação, e menor fator de forma e taxa de circularidade.

A análise coletiva que teve como objetivo distinguir a qual grupo pertence cada célula individualmente, apresentou similaridade entre EJ e EP quando as medidas uni, bi e tri dimensionais foram agrupadas (Figura 1-A), e também mostrou similaridade quando apenas os descritores de forma foram agrupados (Figura 1-B).

Os resultados obtidos neste estudo apontam que EP e EJ, coletados dos mesmos touros, são morfologicamente semelhantes em 19 dos 24 parâmetros avaliados, indicando que a ausência de plasma seminal não afeta a morfologia de EP.

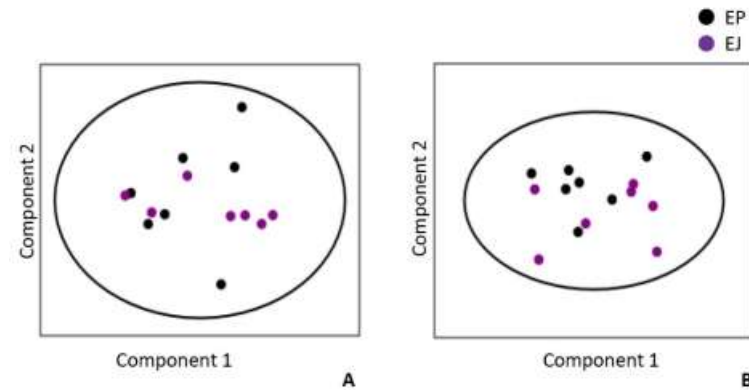


Figura 1. Análise dos componentes principais dos espermatozoides recuperados do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) utilizando medidas uni, bi e tri dimensionais (A) e descritores de forma (B). Cada ponto representa um touro em cada grupo. A análise foi realizada utilizando 20 espermatozoides por touro, 140 espermatozoides por grupo.

Tabela 2. Valores \pm (DP) de medidas dos descritores de forma de espermatozoides recuperados do epidídimo (EP) e do ejaculado (EJ) avaliados por microscopia de força atômica.

| Grupo | Distorção | Grau de Circularidade | Rugosidade | Grau de fineza | Fator de forma | Circularidade | Taxa de aspecto | Diâmetro efetivo | Taxa de circularidade | Taxa de compactação | Elongação | Circularidade em grau |
|-------|-----------------|-----------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|
| EJ | 0,72 \pm 0,05 | 2,27 \pm 0,13 | 1,62 \pm 0,07 ^a | 1,65 \pm 0,15 | 0,62 \pm 0,03 ^a | 0,45 \pm 0,02 | 1,53 \pm 0,13 | 7,81 \pm 0,26 | 0,62 \pm 0,03 ^a | 0,67 \pm 0,02 | 20,24 \pm 0,85 ^a | 0,79 \pm 0,02 |
| EP | 0,74 \pm 0,05 | 2,26 \pm 0,09 | 1,54 \pm 0,06 ^b | 1,60 \pm 0,17 | 0,65 \pm 0,03 ^b | 0,45 \pm 0,02 | 1,46 \pm 0,17 | 7,94 \pm 0,23 | 0,65 \pm 0,03 ^b | 0,67 \pm 0,01 | 19,23 \pm 0,72 ^b | 0,81 \pm 0,02 |

Valores obtidos pela média \pm desvio padrão de 140 espermatozoides por grupo.

^{a,b} Dentro de cada coluna difere EJ e EP, analisados pelo T teste ($P \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDON, F. & SUAREZ, S.S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Research Reproduction**, v. 146, p.111–117, 2009.
- BARBOZA, J. M.; MEDINA, H.; DORIA, M.; RIVERO, L.; HERNANDEZ, L.; JOSH, N. V. Use of atomic force microscopy to reveal sperm ultrastructure in HIV patients on highly active antiretroviral therapy. **Archives of andrology**, v. 50, p. 121-129, 2004.
- BERTOL, M. A. F.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; ABREU, A.; PEREIRA, J. F. S.; DA SILVA, J. J. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 degrees C-20 degrees C). **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1014-1021, 2016.
- BONATTO, C. C.; MAGALHÃES, B. S.; BRANCO, J. O.; DURIGON, E. L.; SILVA, L. P. Shape and size of red blood cells from the Pygoscelid penguins of Antarctica using atomic force microscopy. **Polar biology**, v. 32, p. 287-293, 2009.
- CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Nanoscale Differences in the Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed by Atomic Force Microscopy. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. e59387, 2013.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-27, 2009.
- COSTA, P. M.; MARTINS, C. F.; FRANCO, V. O.; REZENDE, L. O. F.; SERENO, J. R. B.; CAMPOS, H. C. F. Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine. **Ciência rural**, v. 41, n. 5, p. 869-874, 2011.
- CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; GUIMARAES, A. L. S.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M.; VIANA, J. H. M.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. **Plos one**, v. 14, n. 1, p. e0209692, 2019.
- CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; KUSSANO, N. R.; MARTINS, C. F.; MOURAO, G. B.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 348-355, 2016.
- DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27-42, 2014.
- ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J. J. The Effects of Cryopreservation on the Morphometric Dimensions

of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Heads. **Reproduction in domestic animals**, v. 41, p. 241-246, 2006.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204-218, 2017.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, 2006.

IERARDI, V.; NICCOLINI, A.; ALDERIGHI, M.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; SOLARO, R. AFM characterization of rabbit spermatozoa. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 7, p. 529-35, 2008.

JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, A.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 438-44, 2007.

MA, Y.; XIE, N.; LI, Y.; ZHANG, B.; XIE, D.; ZHANG, W.; LI, Q.; YU, H.; ZHANG, Q.; NI, Y.; XIE, X. Teratozoospermia with amorphous sperm head associate with abnormal chromatin condensation in a Chinese family. **Systems biology in reproductive medicine**, p. 1-10, 2018.

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

MATAS, C.; SANSEGUNDO, M.; RUIZ, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; ROMAR, R.; COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1327-1340, 2010.

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine Spermatozoa and Modulate Capacitation by Heparin. **Biology of reproduction**, v. 42, 1990.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR, L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 540-54, 2016.

SAEKI, K.; SUMITOMO, N.; NAGATA, Y.; KATO, N.; HOSOI, Y.; MATSUMOTO, K.; IRITAN, A. Fine surface structure of bovine acrosome-intact and reacted spermatozoa observed by atomic force microscopy. **Journal of reproduction and development**, v. 51, p. 293-298, 2005.

SILVA, L. P. Imaging Proteins with Atomic Force Microscopy: An Overview. **Current protein and peptide science**, v. 6, p. 387-395, 2005.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

WHITED, A. M.; PARK, P. S. Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 1 Pt A, p. 56-68, 2014.

ARTICLE 2

SHAPE AND SIZE OF EPIDIDYMAL SPERM FROM GIR BULLS USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY: A NANOSCALE CHARACTERIZATION

Cunha, A.T.M¹; Silva, L.P²; Carvalho, J.O³; Dode M.A.N².

- 1- Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil;
- 2- Laboratory of Nanobiotechnology, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil;
- 3- Veterinary Medicine Department, University of Espírito Santo, Alegre, Brazil;
- 4- Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil.

ABSTRACT

As epididymal sperm (EP) are not exposed to seminal plasma, they are physiologically different from ejaculated spermatozoa (EJ). Therefore, the aim of this study was to morphologically characterize the head of EP recovered from the epididymis tail, and to evaluate if the physiological differences between EP and EJ were also expressed in the head's shape and size. EP and EJ were recovered from seven Gir bulls and were individually assessed. Sperm cells were washed, fixed, and 20 cells from each animal were analyzed by atomic force microscopy (AFM). The images were acquired through contact mode. Then, an off-line processing software was used and the images acquired were manually segmented using digital zoom of the original images. Twenty-four structural features were assessed including one, two, and three dimensional parameters, and also shape descriptors which were calculated based on the one and two dimensional parameters. Data were compared by T test, then, a collective analysis was performed using principal component analysis (PCA). The EP group presented higher roughness and elongation ($P \leq 0.05$), and smaller form factor and circularity rate than that of the EJ group ($P \leq 0.05$). For the other parameters no differences ($P \geq 0.05$) were observed. In addition, in the PCA analysis no differences among EP and EJ were observed either ($P \leq 0.05$). This study showed that EP and EJ collected from the same sire presented similar characteristics in nineteen of the twenty-four parameters evaluated, indicating that absence of seminal plasma does not affect the morphology of EP.

Key words: sperm head; cattle; morphology.

INTRODUCTION

When sperm cells leave the testes, they are not yet able to fertilize an oocyte, since they need to undergo two important extra-testicular processes; maturation and capacitation. As soon as they are released in the lumen of the seminiferous tubules of the testis, they are transported to the epididymis. During their transit in the epididymis, sperm undergo maturation process, which is characterized by both morphological and physiological modifications that are necessary for them to acquire fertility. These modifications include changes in the biochemical profiles of sperm membrane, final condensation of chromatin, transit of the cytoplasmic droplets, and acquisition of progressive motility (Cornwall, 2009; Dacheux e Dacheux, 2014; Gervasi e Visconti, 2017).

After sperm transit through the epididymis, matured sperm are stored in the epididymis tail until ejaculation, when are mixed with seminal plasma. At this time, spermatozoa are coated in a series of molecules including heparin binding proteins family called "Binder Sperm Proteins" (BSPs). This coating is responsible for important events such as the stability of the plasma membrane, formation of sperm reservoirs, formation of membrane specific sites for heparin binding, capacitation, and sperm binding to the zona pellucida (Miller *et al.*, 1990; Thérien *et al.*, 1998; Manjunath e Thérien, 2002; Gwathmey *et al.*, 2006; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016).

Since epididymal sperm (EP) are not exposed to seminal plasma, they are physiologically different from the ejaculated spermatozoa (EJ) (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2019). In fact, the physiological differences between EP and EJ regarding resistance to refrigeration, post-thaw longevity, and binding to isthmus cells have already been demonstrated (Cunha *et al.*, 2016). More recent findings using in vitro assays suggest that EP are responsive to heparin supplementation (Cunha *et al.*, 2019), and require less time for in vitro capacitation (Matas *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2019) than EJ sperm. All of these physiological differences lead us to hypothesize that the morphology of EP could also be different to EJ sperm.

This question was also raised by another study using Iberian red deer (Esteso *et al.*, 2006); however, this study used conventional light microscopy. Most of the reports that study the characterization of EJ sperm use protocols that include dyes, and usually the structural dimensions are determined manually, which may not detect possible differences. In fact, studying rabbit spermatozoa, Ierardi *et al.* (2008) showed that the precise details of

the spermatozoa structure could not be detected by manual methods that offer limited resolution. One alternative to evaluate the morphology more accurately is to use atomic force microscopy (AFM) technique which represents an effective tool for analyze topographical surfaces of biological or non biological samples with resolution at nanoscale. This technique has become an invaluable multidisciplinary tool for the advanced characterization of different materials. In its basic application, it provides high-resolution images of surface structures at scales ranging from a few nanometers to hundreds of micrometers (Silva, 2005; Whited e Park, 2014).

AFM-based strategies have been used for studies of the sperm cell such as structural characterization (Ierardi *et al.*, 2008), analysis of organization of sperm plasma membrane (Jones *et al.*, 2007; Whited e Park, 2014), investigation of specific morphological defects (Saeki *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018), and interaction of extracellular molecules with membrane proteins (Barboza *et al.*, 2004; Whited e Park, 2014). However, to our knowledge, no studies have been conducted comparing EJ and EP from the same animal using AFM-based approaches.

Thus, the aim of this study was to use AFM as a tool to morphologically characterize EP and to compare its morphology with EJ sperm of the same sires.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and ethics committee approval

Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All procedures with animals were approved by the Ethics Committee of Embrapa's Animal Genetic Resources and Biotechnology (Protocol CEUA–Cenargen 004/2013).

Animals

Seven Gir bulls (*Bos taurus indicus*) aged between 36 and 40 months were selected and used for EP and EJ sperm recovery. Animals were raised in an extensive system and fed pasture (*Brachiaria brizantha*), with mineral salt and water provided *ad libitum*. Prior to the experiment, the bulls were subjected to three andrological evaluations, and only sires that showed a subjective total sperm motility of at least 70 % and a minimum of 70 % morphologically normal sperm were used for the experiment.

Sperm collection and cryopreservation

Sperm samples were collected from ejaculate and the epididymal tail of the same animal according to the method described by Cunha *et al.* (2016). Briefly, one ejaculate was collected via electroejaculation from each Gir bull and seven to fifteen days after semen collection, all sires were orchietomized. The testes were cleaned with saline solution (0.9 % NaCl) and 70% ethanol, and sperm collection from the cauda epididymis was performed (Cunha *et al.*, 2016). Each epididymis was thoroughly cleaned and the superficial blood vessels of the tail were punctured so that most of the blood could be removed. Next, the sperm from the epididymis tail were collected by a series of cuts.

After recovery, the EJ or EP spermatozoa were diluted in Tris-citrate-yolk-glycerol Dilutris extender (SEMENCON–Agricultural Products Ltd., Porto Alegre, RS, Brazil), loaded at a concentration of $25\text{--}30 \times 10^6$ sperm/straw (0.25 mL) and cryopreserved.

Sperm processing for analysis

One straw of each animal from each group (EP and EJ) was thawed at 37°. After thawing, one aliquot of 20 μL from each animal sample was removed for acrosome integrity assessments and the remaining was processed to AFM analyses according to Carvalho *et al.* (2013). Briefly, each sperm sample was centrifuged for 5 min at $200 \times g$ to remove the extender. The supernatant containing the extender was discarded and the pellet was fixed for 5 min in 1 mL of formaldehyde saline (1.6 %) and then centrifuged for 5 min at $200 \times g$. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was washed by centrifugation twice in 1 mL of ultrapure water for 5 min at $200 \times g$. Finally, the pellet was resuspended in approximately 150 μL of ultrapure water and 2 μL of this sample were deposited onto glass coverslips and air dried for AFM assessments.

Acrosome integrity analysis

Acrosome status was assessed using fluorescein isothiocyanate conjugated with peanut agglutinin (FITC-PNA, Invitrogen, Eugene, USA) and propidium iodide (PI) (Molecular Probes, Eugen, USA) as previously described (Cunha *et al.*, 2019). The working solution for staining consisted of 100 μL of sodium citrate (3 % diluted in 0.9% NaCl), 1 μL of PI (0.5 mg/mL), and 1.5 μL of FITC-PNA solution (1 mg/mL in PBS). PI-negative sperm were considered alive, and PI-positive sperm were considered dead. Alive or dead cells were

classified as acrosome-reacted (FITC-PNA positive) or as acrosome-intact (FITC-PNA negative).

Assessments were performed by flow cytometry on an AMNIS FlowSight Image Cytometer (Amnis Corp., Seattle, WA) using the INSPIRE V6.1 acquisition software. Fluorescent dyes were excited by lasers at 488 nm at 10 mW and 405 nm at 30 mW. A specific acquisition template was previously created for identifying and acquiring only sperm cells. Thus, 10,000 events were collected per sample/parameter evaluated. For analysis of the results, dot plot graphs were created from unstained control samples, and the populations were gated based on stain patterns.

Atomic force microscopy analysis

For the AFM analyses (Figure 2), a SPM-9600 microscope (Shimadzu, Japan) was used and the images were acquired by contact mode (Bonatto *et al.*, 2008), using 200 μm length V cantilevers (constant of ~ 0.15 N/m, 24 kHz resonance frequency) with integrated pyramidal tip (radius of curvature <20 nm). A scanner with a The 100 μm extension was used for scanning travel following the XY direction and 7 μm in the Z direction. The acquisition of the images was performed at 512×512 pixels and a scan rate of 1 Hz.

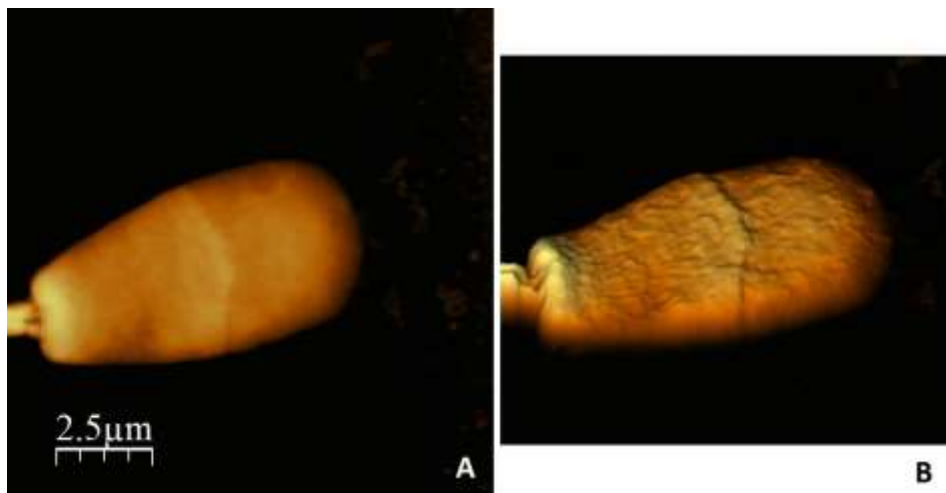


Figure 2. Atomic force microscopy images of 2D (A) and 3D view (B) of epididymal sperm.

The images were processed according to Carvalho *et al.* (2013), using SPM-9600 off-line software. The processing consisted of an automatic plane fit leveling the surface. A total of forty individual cells, twenty cells per each group (EP and EJ) were assessment per animal and manually segmented using a digital zoom of the original image whilst using the labeling function of the particle analysis software. Then, cell measurements were performed

on the sperm head. Twenty-four characteristics were assessed, including one, two, and three dimensional measures, and shape descriptors. Shape descriptor values were obtained using a mathematical formula with one and two dimensional values (for details, see mathematical formulas below).

Mathematical formulas used to generate the shape descriptors

In this study, shape descriptors were calculated using the mathematical formulas described below.

Form factor: $(4 \times \pi \times \text{Area excluding hole}) / (\text{Perimeter} \times \text{Perimeter})$.

Roundness: $(4 \times \text{Area including hole}) / \pi \times (\text{Maximum diameter} \times \text{Maximum diameter})$.

Aspect ratio: $\text{Maximum diameter} / \text{Pattern width}$.

Effective diameter: $(\text{Area including hole} / \pi) \times 2$.

Circular degree: $\pi \times \text{maximum diameter} / 4 \times \text{area excluding hole}$.

Circularity ratio: $(4 \times \pi \times \text{Area including hole}) / \text{Perimeter} \times \text{Perimeter}$.

Thin degree: $\text{maximum diameter} / \text{pattern width}$.

Compact aspect rate: $(\text{square root} ((4/\pi) \times \text{Area including hole})) / \text{Maximum diameter}$.

Elongation: $(\text{Perimeter} \times \text{Perimeter}) / \text{Area including hole}$.

Roughness: $(\text{Perimeter} \times \text{Perimeter}) / (4 \times \pi \times \text{area excluding hole})$.

Statistical analyses

Data from the means of the twenty-four parameters obtained by AFM and the acrosome assessments and the characters of each animal were compared between the groups (EP and EJ) by T test ($P \leq 0.05$). Then, the twenty-four parameters were also collectively evaluated by a principal component analysis (PCA). All data were analyzed by Past3 software and are presented as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

To avoid an effect of the absence of acrosome in the sperm head volume, one sample from each animal was removed for the evaluation of the acrosomal integrity. According to Figure 1, no differences in the percentage of cells with intact acrosomes were detected among the EP (18.07 %) and EJ (22.15 %) groups.

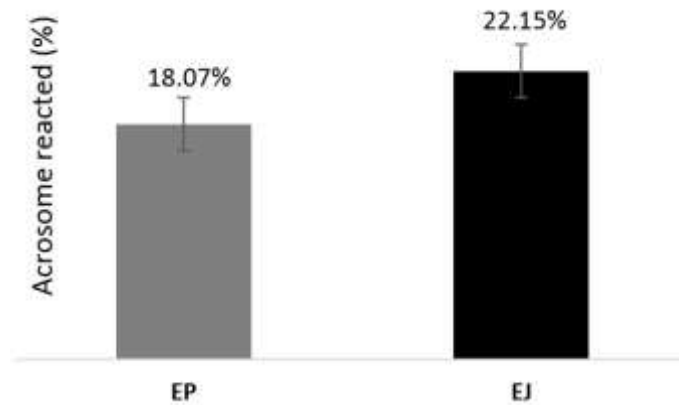


Figure 1. Percentage of sperm cells with acrosome reacted of bovine spermatozoa (mean obtained from seven sires) recovered from epididymal tail (EP) and ejaculation (EJ). Data analyzed by Tukey test ($P \leq 0.05$).

The values for one, two, and three dimensional parameters are depicted in Table 1, which showed no significant differences between the EJ and EP sperm heads. Otherwise, shape descriptors (Table 2) showed that the EP group presented higher roughness and elongation, and smaller form factor and circularity rate than that of the EJ group.

Table 1. One, two, and three dimensional values (\pm SD) of bovine sperm recovered from epididymal (EP) and ejaculated (EJ) sources, as evaluated by atomic force microscopy.

| Measures of structural characteristics one dimensional | | | | | | | |
|--|-------------------------------|--|---|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Groups | Mean Radius (μm) | Mean Radius Variance (μm) | Maximum Z (μm) | Minimum Z (μm) | Average Z (μm) | Maximum Diameter (μm) | Pattern Width (μm) |
| EP | 4.14 \pm 0.13 | 1.11 \pm 0.08 | 0.48 \pm 0.05 | 0.16 \pm 0.02 | 0.29 \pm 0.04 | 11.69 \pm 0.4 | 7.69 \pm 0.58 |
| EJ | 4.21 \pm 0.14 | 1.13 \pm 0.06 | 0.52 \pm 0.03 | 0.16 \pm 0.02 | 0.31 \pm 0.04 | 12.13 \pm 0.49 | 9.32 \pm 1.11 |
| Measures of structural characteristics two and three dimensional | | | | | | | |
| Groups | Perimeter (μm) | C Perimeter (μm) | Area including hole (μm^2) | Surface area (μm^2) | Volume (μm^3) | | |
| EJ | 30.9 \pm 1.2 | 28.4 \pm 1.3 | 49.6 \pm 2.9 | 50.4 \pm 2.9 | 15.9 \pm 2.2 | | |
| EP | 31.1 \pm 1.3 | 28.2 \pm 1.0 | 47.9 \pm 3.2 | 48.8 \pm 3.4 | 15.6 \pm 2.3 | | |

Values are a mean \pm of 140 sperm cells for each group. No difference were observed ($P > 0.05$).

A simultaneous evaluation of all the measured traits was performed using a PCA, to determine if it was possible to distinguish and identify to which group belong the cells of each individual.

Table 2. Shape descriptor parameters (\pm SD) of the bovine epididymal (EP) and ejaculate (EJ) sperm evaluated by atomic force microscopy.

| Group | Distortion | Circular Degree | Roughness | Thin Degree | Form Factor | Roundness | Aspect Ratio | Effective diameter | Circularity ratio | Compact aspect rate | Elongation | Degree of circularity |
|-------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|
| EJ | 0.72 \pm 0.05 | 2.27 \pm 0.13 | 1.62 \pm 0.07 ^a | 1.65 \pm 0.15 | 0.62 \pm 0.03 ^a | 0.45 \pm 0.02 | 1.53 \pm 0.13 | 7.81 \pm 0.26 | 0.62 \pm 0.03 ^a | 0.67 \pm 0.02 | 20.24 \pm 0.85 ^a | 0.79 \pm 0.02 |
| EP | 0.74 \pm 0.05 | 2.26 \pm 0.09 | 1.54 \pm 0.06 ^b | 1.60 \pm 0.17 | 0.65 \pm 0.03 ^b | 0.45 \pm 0.02 | 1.46 \pm 0.17 | 7.94 \pm 0.23 | 0.65 \pm 0.03 ^b | 0.67 \pm 0.01 | 19.23 \pm 0.72 ^b | 0.81 \pm 0.02 |

Values are an average of 140 sperm cells for each group.

^{a,b} Within each column indicate significant differences between EP and EJ groups as analyzed by a Tukey test ($P \leq 0.05$).

The results are showed in Figure 3, in which both groups are represented by just one cluster, containing dots of different colors. Meaning that the EP and EJ groups can not be distinguished from each other.

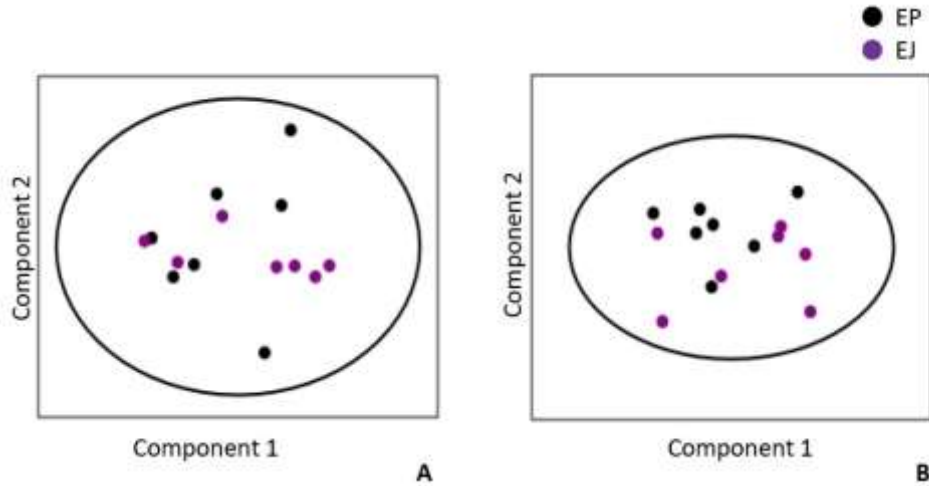


Figure 3. Principal component analysis of the sperm recovered from the epididymal tail (EP) and ejaculate (EJ) using one two and three dimensional measurements (A) and using shape descriptor parameters (B). Each point represents one bull of each group, from the average of 20 sperm cells per bull, to a total of 140 sperm cells for each group.

DISCUSSION

The use of EP in reproductive biotechnology represents an alternative for the storage and use of gametes recovered from individuals with acquired fertility problems or that die suddenly. Although there are physiological differences between EP and EJ sperm, such as capacitation process and longevity (Matas *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2019), EP can fertilize an oocyte as efficiently as EJ sperm. The differences in physiological behavior, mainly due to not being exposed to seminal plasma, could lead to morphological differences such as dimensions or shape of the sperm head. These characteristics are not perceptible in routine evaluations using conventional light microscopy (Esteso *et al.*, 2003; Esteso *et al.*, 2006), and may be detected using other techniques. AFM is able to detect differences between the size and shape of various biological molecules, such as proteins and extracellular molecules that adhere to the membrane (Barboza *et al.*, 2004; Gonçalves, 2010; Whited e Park, 2014).

Therefore, to test our hypothesis that EP and EJ, besides being different in their physiological behavior, are also morphological different, we chose to use AFM for the analysis of sperm morphology.

It is well described that the pre-equatorial region of the sperm head with a reacted acrosome is approximately 40 % smaller than that of the spermatozoon with an intact acrosome (Saeki *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007). Therefore, to avoid interference of the acrosomal volume on the total volume of the spermatozoon head between groups, one sample from each animal was evaluated for acrosome integrity. No differences were found between the EP and EJ groups for acrosome integrity.

Regarding to AFM analysis, size and shape of the spermatozoa were similar between the EP and EJ for all parameters observed in one, two, and three dimensional measurements. However, among shape descriptors, roughness and elongation showed higher values, and form factor and circularity rate showed lower values for EP group than for EJ group. In human and bovine sperm, roughness has been correlated with acrosomal reaction (Saeki *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007). However, in the present study the amount of spermatozoa with an acrosome reaction was similar between the EP and EJ groups, and could not explain the difference found between them. It is possible that other characteristics of EP plasma membrane such as the absence of seminal plasma proteins and quantity of cholesterol can also be responsible by these shape descriptors differences. In an attempt to verify if the EP and EJ could be distinguished from each other when various characteristics are simultaneously taken into account, a PCA was performed. According to our results, PCA analysis failed in discriminating groups of sperm.

In a previous study from our group using sexed sperm (Carvalho *et al.*, 2013), differences in some shape descriptors were also observed. However, in that study, it was possible to differentiate sperm cell carrying X from those carrying Y chromosome by multivariate analysis. In contrast, in the present even though there were difference in some shape descriptors data between EP and EJ, these differences were not sufficient to differentiate EP from the EJ group.

It is possible that some factors involved in sample preparation could have contributed to this lack of difference. One example is the washing steps for coverslip preparations that could remove or cleave the structures present in the EJ membrane. In addition to the washing process, another factor that may have interfered with the results is cryopreservation. Cryopreservation could induce changes in both the EP and EJ, so that when they were thawed, they showed similar characteristics. In fact, the cryopreservation process has already been reported to modify the structure of the molecules that are

anchored to the membrane (Ardon e Suarez, 2013), as well as decrease sperm dimensions (Esteso *et al.*, 2003; Esteso *et al.*, 2006).

On the other hand, we used the same animals as the donors of EP and EJ, avoiding variation among individuals, which allows having greater confidence in the data. Thus, the results showed that the lack of exposure to seminal plasma does not induce a perceptible change on overall sperm morphology. This knowledge about EP morphology assessed by a tool that can identify even nanostructures can have an important application in the field of studies regarding EP and epididymis biology.

Based on the obtained results, it is possible to confirm that sperm recoveries from EP are morphologically similar to EJ in most of the aspects evaluated, indicating that absence of seminal plasma does not affect the morphology of EP.

REFERENCES

- ARDON, F. & SUAREZ, S.S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Research Reproduction**, v. 146, p.111–117, 2009.
- BARBOZA, J. M.; MEDINA, H.; DORIA, M.; RIVERO, L.; HERNANDEZ, L.; JOSH, N. V. Use of atomic force microscopy to reveal sperm ultrastructure in HIV patients on highly active antiretroviral therapy. **Archives of andrology**, v. 50, p. 121-129, 2004.
- BONATTO, C. C.; MAGALHÃES, B. S.; BRANCO, J. O.; DURIGON, E. L.; SILVA, L. P. Shape and size of red blood cells from the Pygoscelid penguins of Antarctica using atomic force microscopy. **Polar biology**, v. 32, n. 2, p. 287-293, 2008.
- CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Nanoscale Differences in the Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed by Atomic Force Microscopy. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. e59387, 2013.
- CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-27, 2009.
- CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; GUIMARAES, A. L. S.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M.; VIANA, J. H. M.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. **Plos one**, v. 14, n. 1, p. e0209692, 2019.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; KUSSANO, N. R.; MARTINS, C. F.; MOURAO, G. B.; DODE, M. A. N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 348-355, 2016.

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27-42, 2014.

ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; J., G. J. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. **CryoLetters**, v. 24, p. 261-268, 2003.

ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J. J. The Effects of Cryopreservation on the Morphometric Dimensions of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Heads. **Reproduction in domestic animals**, v. 41, p. 241-246, 2006.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204-218, 2017.

GONÇALVES, R. P. Atomic Force Microscopy Imaging of Membrane Proteins. **Acta physica polonica**, v. 117, p. 18-23, 2010.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 4, p. 501-7, 2006.

IERARDI, V.; NICCOLINI, A.; ALDERIGHI, M.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; SOLARO, R. AFM characterization of rabbit spermatozoa. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 7, p. 529-35, 2008.

JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, A.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 4, p. 438-44, 2007.

KUMAR, S.; CHAUDHURY, K.; SEN, P.; GUHA, S. K. Quantitative analysis of surface micro-roughness alterations in human spermatozoa using atomic force microscopy. **Journal of microscopy**, v. 227, p. 118-123, 2007.

MA, Y.; XIE, N.; LI, Y.; ZHANG, B.; XIE, D.; ZHANG, W.; LI, Q.; YU, H.; ZHANG, Q.; NI, Y.; XIE, X. Teratozoospermia with amorphous sperm head associate with abnormal chromatin condensation in a Chinese family. **Systems biology in reproductive medicine**, p. 1-10, 2018.

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

MATAS, C.; SANSEGUNDO, M.; RUIZ, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GADEA, J.; ROMAR, R.; COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1327-1340, 2010.

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine Spermatozoa and Modulate Capacitation by Heparin. **Biology of reproduction**, v. 42, 1990.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR, L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 540-54, 2016.

SAEKI, K.; SUMITOMO, N.; NAGATA, Y.; KATO, N.; HOSOI, Y.; MATSUMOTO, K.; IRITAN, A. Fine surface structure of bovine acrosome-intact and reacted spermatozoa observed by atomic force microscopy. **Journal of reproduction and development**, v. 51, p. 293-298, 2005.

SILVA, L. P. Imaging Proteins with Atomic Force Microscopy: An Overview. **Current protein and peptide science**, v. 6, p. 387-395, 2005.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

WHITED, A. M.; PARK, P. S. Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 1 Pt A, p. 56-68, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados destes estudos, pode-se observar que embora a literatura ainda não descreva outros receptores de heparina na membrana plasmática de espermatozoides bovinos, EP são responsivos à suplementação com heparina. É possível que outras moléculas ainda não identificadas, presentes na membrana plasmática de EP, atuem como receptores para a heparina. Estudos futuros utilizando anticorpos podem auxiliar no esclarecimento desta hipótese.

Ao realizarmos a avaliação de diferentes formas de selecionar espermatozoides EP para a PIVE, os resultados mostraram que o uso do gradiente resulta em uma maior produção embrionária. No entanto, a seleção espermática de EP com PureSperm ou Percoll resultou em um desvio na proporção do sexo dos embriões produzidos.

Outro resultado importante observado foi que o período de co-incubação entre espermatozoide-ovócito ao utilizar EP pode ser reduzido para 6h; EP e EJ são morfologicamente semelhantes. Isso porque identificamos que o EP capacita mais rapidamente, em consequentemente fecunda mais rápido. Sendo assim, concluímos que ao utilizar EP o tempo necessário para a PIVE pode ser reduzido e que o uso de gradiente descontínuo é necessário para se obter taxa de fecundação semelhante a obtida com EJ.

Considerando os resultados observados com o uso de EP na PIVE bovinos, as descobertas deste trabalho podem ser utilizadas como modelo para o uso de EP recuperados de animais em extinção, representando uma grande importância na preservação de espécies em extinção, ou em ameaça de extinção.

Estudos adicionais que investiguem a existência e a localização de receptores para a heparina na membrana plasmática de EP, bem como o seu mecanismo de ação no processo de capacitação são fundamentais para elucidar a fisiologia de EP diante da heparina.