

JULIA DE LIMA SIMÕES

**Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros  
PRÉ e PÓS Percoll® e correlação com o desenvolvimento  
embrionário**

São Paulo

2021

JULIA DE LIMA SIMÕES

**Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros  
PRÉ e PÓS Percoll® e correlação com o desenvolvimento  
embrionário**

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

**Departamento:**

Reprodução animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila  
Assumpção

São Paulo

2021

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4072  
FMVZ

Simões, Julia de Lima  
Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros PRÉ e PÓS Percoll® e correlação com o desenvolvimento embrionário / Julia de Lima Simões. – 2021.  
74 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. PIVE. 2. Capacitação. 3. Gradiente de densidade. I. Título.

## Certificado da Comissão de Ética (obrigatório)

---



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### DECLARAÇÃO

Declaramos que, por motivos técnicos, o sistema eletrônico de avaliação de propostas à Plataforma Orion da CEUA da FMVZ/USP encontra-se fora do ar para manutenção, sem previsão definida de retorno.

Desta forma, esta CEUA/FMVZ aprovou a solicitação enviada pela responsável Profa. Dra. Mayra Elena Oríz D' Ávila Assumpção do projeto CEUA 5147101018, sendo que não foram observados impedimentos para a alteração do título da proposta para "Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros pré e pós Percoll e correlação com o desenvolvimento embrionário".

Esta declaração se faz necessária, em caráter excepcional, para que o aluno mencionado acima possa fazer o depósito da sua dissertação, junto à Comissão Pós-graduação desta FMVZ/USP.

São Paulo, 3 de maio de 2021.

Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SIMÕES, Julia de Lima

Título: **Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros PRÉ e PÓS Percoll® e correlação com o desenvolvimento embrionário**

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico às pessoas mais importantes e amadas da minha vida, meu irmão Gabriel e minha mãe Mônica.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus e a espiritualidade por essa oportunidade única na minha vida, por toda a força e proteção. Meu coração transborda alegria e gratidão pelo mestrado e por todas as pessoas que andaram ao meu lado nessa caminhada.

Gostaria de agradecer o Professor Marcelo Goissis por ter aberto as portas da USP e através dele conhecer a minha orientadora Professora Mayra. Agradeço ele por todos os ensinamentos e conhecimento durante esses dois anos.

Agradeço imensamente a minha amada e admirada orientadora Professora Mayra por ter me acolhido, me incentivado, acreditado em mim e me proporcionado tanto aprendizado. Exemplo de profissional, mãe, amiga e um dos meus maiores exemplos de mulher. Mulher que faz nossos olhos e coração brilhar diante dela. Professora Mayra vai muito além de orientadora, ela é amiga, mãe, pai e porto seguro de seus alunos. Sorte de quem tem a oportunidade de estar junto dela. Espero não ter te decepcionado e ter de dado pelo menos um pouquinho de orgulho. Obrigada por tanto Prof.

Agradeço muito a Thais, sem ela nada disso seria possível, Thais esteve comigo em todos os momentos do mestrado. Mulher admirável que tem um conhecimento profissional imenso. Obrigada por toda ajuda no meu projeto e obrigada pelos momentos de conversa e amizade. Eterno carinho e gratidão por você.

Gostaria de agradecer a Camilla Mota por tanto! Mulher com um coração imenso que não mede esforços para ajudar todo mundo. Agradeço por todo puxão de orelha, por todas as comidas incríveis que levava para nós, principalmente pelo maravilhoso bolo de milho. Obrigada por tudo Cá, vou te levar sempre no meu coração.

Agradeço pelos meus amiguinhos tão amados do laboratório, Vi minha amiga obrigada por ser quem você é para mim. Dri por toda ajuda no meu projeto, todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos e por todas as palavras que acalentava sempre meu coração. Lê Castro amiga que me ensinou tanto e sempre esteve ao meu lado,

obrigada pelos momentos maravilhosos ao seu lado. Carol por todas as conversas e trocas de ensinamentos durante esses anos. Tetinha meu amigo, pessoa do bem que esteve sempre ao meu lado. Paquito meu amigo que nunca desgrudou de mim ahahaha obrigada pela amizade e por tudo que passamos juntos. Aos ICS Julia, Aline, Matheus que estiveram comigo nessa jornada.

Agradeço aos meus amigos do VRA por tantos momentos incríveis, Rapha, Mônica, Renato, Damiana, Laísa, Luana, Denner.

Agradeço aos alunos do LA que me ajudaram na etapa de avaliação do CASA, Raphaela, Roberta e João Diego.

Grande agradecimento a minha família de SP, Felipe e João meus amigos, meus irmãos. Não imagino minha vida sem vocês! Obrigada pela parceria, amizade, por toda ajuda, por me aguentarem ahahaha, por todo perrengue em SP, todas as risadas, cervejas, jantas e por todo amor e alegria que construímos e preservamos durante esses anos no nosso apzinho. Quanta saudade meus amigos.

Quero agradecer a todos os Professores e funcionários do VRA, principalmente Professor Marcílio, Professora Claudia e Harumi.

Um agradecimento especial a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e ao Programa de Pós Graduação em Reprodução animal.

Agradeço a Capes por todo auxílio, ao CNPQ que me concedeu a bolsa de mestrado e ao programa PAE.

Quero agradecer pelos meus amados amigos e familiares de Franca. Meu querido e tão amado irmão Gabriel, ao meu irmão Cairo, aos meus sobrinhos João Pedro e Luís Felipe, minhas primas Aninha e Bia, tia Má e tio Eder, Tio Renatão, Vô Sicio, Rafa minha melhor amiga, Gi e Bibi.

Por fim quero agradecer a pessoa mais importante na minha vida que é a minha mãe, obrigada mãezinha por tudo, você é responsável por tudo isso. Obrigada por todo



exemplo de mulher batalhadora, independente, vencedora, amorosa, bondosa e incrível. Obrigada por fazer tanto por mim e por estar ao meu lado sonhando meus sonhos e vivendo minha vida. Te amo infinito.

## RESUMO

SIMÕES, J. L. **Avaliação da sinalização de zinco em amostras seminais de touros PRÉ e PÓS Percoll® e correlação com o desenvolvimento embrionário.** 2021. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A produção *in vitro* de embrião (PIVE) em bovinos consiste na maturação do oócito (MIV), fecundação (FIV) e subsequente cultivo *in vitro* (CIV). Para o sucesso em cada etapa, os gametas precisam de alguns requisitos. Em relação ao espermatozoide, as células precisam ser capacitadas para a fecundação *in vitro* para gerar o zigoto. O processo de capacitação espermática deixa a célula pronta para a fecundação por meio de alterações funcionais e estruturais resultando em mudanças de permeabilidade na membrana celular, promovendo o influxo de cálcio. Além do cálcio, estudos recentes descreveram a participação do zinco no processo, podendo ser um novo método para avaliar a capacitação espermática. O espermatozoide precisa ser capacitado para fecundar, no entanto, uma capacitação prematura é prejudicial, pois inviabiliza a célula para sua principal função. A manipulação, congelação/descongelação, preparação de espermatozoides para a PIVE e a seleção de células podem ocasionar esta capacitação prematura. Para a FIV, há a necessidade de se separar os espermatozoides com motilidade, sendo o gradiente de densidade Percoll® o mais utilizado em bovinos. Ainda não está claro se a submissão do sêmen a esse gradiente promove a capacitação completa dos espermatozoides, refletindo negativamente na produção *in vitro* de embriões, sendo este o objetivo do presente estudo. Para tanto, sêmen de 10 touros Nelore, foi submetido (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de densidade Percoll®. A motilidade espermática foi avaliada por análise computadorizada (CASA) e a integridade da membrana plasmática (PI) e o potencial de membrana mitocondrial (JC1) por citometria de fluxo. A capacitação espermática foi avaliada por ensaio de fluorescência de clortetraciclina (CTC) e as assinaturas de zinco utilizando a sonda de fluorescência FluoZin™ -3 AM (FZ3). Por fim foi realizado a produção *in vitro* de embriões utilizando as amostras seminais submetidas ao gradiente Percoll®. Foi realizado a correlação entre as taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário com as variáveis de capacitação. O grupo **PRÉ** (não submetido ao gradiente Percoll®) apresentou maior porcentagem de espermatozoides capacitados, quando comparado ao grupo **PÓS**,

que apresentou maior quantidade de espermatozoides não capacitados. O grupo **PRÉ** apresentou também, maior porcentagem de espermatozoides reagidos na avaliação da CTC e maior porcentagem de espermatozoides com retilinearidade, quando comparados aos espermatozoides submetidos ao gradiente Percoll®. Foi possível observar uma correlação negativa entre a assinatura de zinco (3 e 4) no espermatozoide, que indica células capacitadas, e a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*, demonstrando que quanto mais células capacitadas **PÓS** Percoll®, menos embriões são produzidos. O gradiente de densidade Percoll® remove os espermatozoides já capacitados das amostras, confirmado pela maior presença de células não capacitadas após o gradiente. A capacitação de espermatozoides detectada pela assinatura de ZN3 correlaciona negativamente com a taxa de blastocisto e desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: PIVE. Capacitação. Gradiente de densidade.

## ABSTRACT

SIMÕES, J L. **Evaluation of zinc signaling in seminal samples from bulls PRE and POST Percoll® and correlation with embryonic development.** 2021. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The *in-vitro* production (IVP) of bovine embryos consists in oocyte maturation, fertilization and consequent *in-vitro* culture. For the success in each step, gametes need some requisites. Concerning the sperm, cells need to be capacitated for *in-vitro* fertilization to generate the zygote. Sperm capacitation process makes the cell ready for fertilization by functional and structural alterations resulting in permeability changes on cell membrane, which promotes calcium influx. Nevertheless, recent studies described zinc as a new method to assess sperm capacitation. Sperm needs to be capacitated to fertilize, but a premature capacitation is harmful for the process. The manipulation, freezing/thawing, sperm preparation for IVP and cell sorting may be involved with this premature capacitation. For IVP viable cells must be separated from the extender and dead cells, being Percoll® gradient the most used in bovine.

It is not yet clear if the submission of semen to a Percoll® gradient promotes complete sperm capacitation, reflecting on *in vitro* embryo production, being this the objective of this study. For that, semen of 10 Nelore Bulls, used on *in-vitro* embryo production were submitted (POST) or not (PRE) to a Percoll® gradient. Sperm motility was evaluated by computer assisted sperm analysis (CASA) and sperm plasmatic membrane integrity (PI), mitochondrial membrane potential (JC1) by Flow Cytometry. Sperm capacitation was evaluated by chlortetracycline fluorescence assay (CTC) and zinc assay with fluorescence probe FluoZin™ -3 AM (FZ3). Finally, *in vitro* embryo production was performed using seminal samples submitted to the Percoll® gradient. A correlation between cleavage rate, blastocyst rate and the embryo development rate with the sperm capacitation variables was performed. Semen not submitted to Percoll® gradient presented higher percentage of capacitated sperm, higher percentage of reacted spermatozoa in CTC evaluation, and higher percentage of sperm with rectilinearity when compared to sperm submitted to Percoll® gradient. In addition, sperm submitted to Percoll® gradient, had a higher percentage of non-capacitated cells when compared to sperm not submitted to Percoll® gradient. We observed a negative correlation between sperm Zinc signature (3 and 4) that indicate capacitated

cells and *in-vitro* embryo development rate, showing that the more capacitated cells, less embryos are produced. Percoll® gradient removes sperm already capacitated from samples, confirmed by the presence of non-capacitated spermatozoa after submitting sperm to Percoll® gradient. This condition seems to be important for bovine *in-vitro* fertilization and subsequently success of bovine *in-vitro* embryo production.

Keywords: IVP. Capacitation. Density gradient.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental.....	31
Figura 2: Microscopia de epifluorescência da avaliação de CTC em espermatozoides bovinos.....	36
Figura 3: Microscopia de epifluorescência da assinatura de zinco em espermatozoides de touro. A presença de $Zn^{2+}$ apenas na peça intermediária. ....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média da porcentagem e erro padrão da média para os atributos espermáticos avaliados por citometria de fluxo para os grupos <b>PRÉ</b> e <b>PÓS</b> , valores de $p$ . .....	40
Tabela 2 - Média e erro padrão da média para as variáveis avaliadas pelo sistema computadorizado de motilidade (CASA) para os grupos <b>PRÉ</b> e <b>PÓS</b> , e valores de $p$ . .....	41
Tabela 3 - Média e erro padrão da média para as variáveis avaliadas para capacitação espermática pelo ensaio de CTC e assinatura de Zinco nos grupos <b>PRÉ</b> e <b>PÓS</b> , e valores de $p$ . .....	42
Tabela 4 - Média e erro padrão da média das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário para cada touro Nelore utilizado neste experimento..	44
Tabela 5 - Tabela de correlação entre as variáveis status de capacitação espermática e as taxas de produção <i>in vitro</i> de embriões, coeficiente de correlação ( $\rho$ ) e probabilidade ( $p$ ). .....	46
Tabela 6 - Tabela de correlação entre as variáveis status de capacitação e atributos espermáticos no grupo <b>PRÉ</b> . .....	49
Tabela 7 - Tabela de correlação entre as variáveis status de capacitação e atributos espermáticos no grupo <b>PÓS</b> . .....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentagem de espermatozoides com diferentes classificações de CTC nos grupos <b>PRÉ</b> e <b>PÓS</b> Percoll®. ....	43
Gráfico 2: Porcentagem de espermatozoides com diferentes assinaturas de Zinco nos grupos <b>PRÉ</b> e <b>PÓS</b> Percoll®. ....	43
Gráfico 3: Gráficos de dispersão. A. Porcentagem de espermatozoides com a assinatura ZN 3 e taxa de produção de blastocistos <i>in vitro</i> . B. Porcentagem de espermatozoides com a assinatura ZN 3 e taxa de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> . ....	46



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	ANÁLISES ESPERMÁTICAS .....	20
2.2	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) .....	22
2.3	GRADIENTE DE DENSIDADE PERCOLL® .....	24
2.4	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	25
2.5	ZINCO .....	26
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
4.1	GERAL.....	30
4.2	ESPECÍFICOS .....	30
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
5.1	CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS.....	31
5.2	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS .....	32
5.3	ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS.....	33
5.3.1	Integridade de membrana plasmática.....	33
5.3.2	Potencial de membrana mitocondrial.....	33
5.3.3	Estresse Oxidativo .....	34
5.4	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA .....	34
5.5	AVALIAÇÃO DO STATUS DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA .....	35
5.5.1	Ensaio de Clortetraciclina.....	35
5.5.2	Assinatura de Zinco.....	36
5.6	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) .....	37
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
6.1	ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	40
6.2	AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA .....	41
6.3	AVALIAÇÃO DO STATUS DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA .....	42
6.4	OBTENÇÃO DOS DADOS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) .....	44
6.5	CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS .....	45
6.5.1	Status de capacitação espermática e taxas de produção in vitro de embriões bovinos .....	45
6.5.2	Status de capacitação e atributos espermáticos.....	47
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>70</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino comercial Brasileiro é considerado o maior do mundo, apresentando em 2020 cerca de 213,68 milhões de animais, sendo registrado, nesse mesmo ano, aumento de 12,2% nas exportações de carne bovina (AIBIEC, 2020). Segundo o IBGE, em 2020 foram abatidos 7,83 milhões de bovinos no 4º trimestre e a aquisição de leite cru foi de 6,75 bilhões de litros, ambos apresentando um recorde histórico. Com o aumento da população mundial, a demanda pela produção de alimentos de origem animal aumenta a cada dia (FAO, 2017), sendo o Brasil um país de extrema relevância na contribuição da produção de alimentos. O desenvolvimento de tecnologias que contribuem para o aumento da produtividade nos rebanhos é muito importante, dentre estas, as biotecnologias aplicadas à reprodução, as quais apresentam grande impacto (BARUSELLI et al., 2019).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia de eleição para obtenção de embriões bovinos (SARTORI et al., 2016) e tem o objetivo de aumentar o número de descendentes em programas de melhoramento genético (VIANA et al., 2010). Quando comparada à obtenção de embriões *in vivo* após superovulação (MOET), a PIVE se destaca na produção de um maior número de bezerros de um mesmo cruzamento (PONTES et al., 2009), porém o seu sucesso depende de vários fatores. A qualidade dos gametas é essencial para um bom resultado, tanto o gameta do macho quanto o da fêmea possuem uma importância significativa (PALMA; SINOWATZ, 2004). Quanto ao gameta feminino, as limitações estão na qualidade e na correta maturação dos oócitos, e os espermatozoides são responsáveis por diferentes resultados na taxa de desenvolvimento embrionário (WARD et al., 2003; ALOMAR et al., 2008), exigindo uma boa qualidade espermática. Outro fato a ser considerado são os fatores intrínsecos de cada animal, chamado de efeito touro que tem mostrado grande significância na PIVE (PALMA; SINOWATZ, 2004; UTT, 2016).

A PIVE consiste em três etapas: maturação oocitária (MIV), fecundação (FIV) e cultivo dos embriões (CIV). *In vivo*, os oócitos sofrem a maturação dentro do folículo ovariano, sob influência de hormônios e moléculas presentes no fluido folicular, que vão mudando ao longo do desenvolvimento folicular e as fases do ciclo estral. Já no processo *in vitro*, os oócitos são obtidos por meio da aspiração folicular utilizando ultrassom (OPU), ou aspirados com agulha e seringa quando oriundos de abatedouro. Por serem aspirados em uma fase precoce, não estão aptos, ainda, para serem

fecundados, por isso várias modificações estruturais e bioquímicas no núcleo e no citoplasma do oócito são necessárias (GONÇALVES et al., 2007). Para contornar isso, no sistema *in vitro*, a maturação é suplementada com hormônios e substâncias para mimetizar os eventos *in vivo*. Na etapa da fecundação, o espermatozoide deve estar apto a fecundar o oócito (HENKEL; SCHILL, 2003). *In vivo*, o espermatozoide precisa passar por um percurso dentro do trato reprodutivo da fêmea que vai desde a vagina até a tuba uterina (HOLT; FAZELI, 2010). Durante esse processo ocorre a seleção de espermatozoides móveis e eles tornam-se aptos a fecundar por meio de mudanças celulares funcionais e estruturais chamada de capacitação espermática (GEORGADAKI et al., 2016). A capacitação espermática ocorre no oviduto da fêmea por influência de moléculas e células que estão presentes no fluido ovidutário (HOLT; FAZELI, 2010). Para tanto, no sistema *in vitro*, as mesmas alterações devem ocorrer. O protocolo *in vitro* consiste em selecionar os espermatozoides móveis, capacitá-los para estarem aptos para a fecundação. A etapa de cultivo dos embriões é bem complexa devido às alterações que ocorrem no oviduto e no útero da fêmea, sendo ainda um processo em constante estudo para ser possível conferir a esse embrião, todo estímulo para seu desenvolvimento *in vitro*.

A capacitação espermática se inicia com o efluxo de colesterol da membrana plasmática (MP) do espermatozoide e na remoção do zinco intracelular, resultando no aumento da permeabilidade e no influxo de íons de cálcio (ANDREWS; BAVISTER, 1989; ABOU-HAILA; TULSIANI, 2009). Esse processo é desencadeado por moléculas e células que estão presente no fluido uterino (CHANG; PINCUS, 1951). Outro evento que ocorre durante o trajeto do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea é a reação acrossomal, que acontece nos espermatozoides capacitados e é caracterizado pela exocitose das enzimas acrossomais (BREITBART; RUBINSTEIN; ETKOVITZ, 2006) e posteriormente pela fusão das membranas do espermatozoide e do oócito (FLÉCHON, 2016).

Para o sucesso do sistema *in vitro*, é necessário adequar o protocolo, o máximo possível, à semelhança do processo *in vivo*. Na etapa da FIV, a técnica mais utilizada para a seleção de espermatozoides móveis é por meio de processos de filtração e migração, sendo o mais utilizado, para a espécie bovina, o gradiente de densidade de sílica coloidal (Percoll®) (O' MEARA et al., 2008). Além disso, é necessário a utilização de agentes capacitantes como heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) e albumina (PARRISH, 2014) para induzir a capacitação espermática nos

espermatozoides e torná-los aptos para a fecundação. Entretanto, não é só mimetizar os eventos, mas também o momento que esses eventos acontecem, sendo o adiantamento ou o retardamento prejudicial ao sucesso do processo. Portanto esse trabalho teve como objetivo avaliar a motilidade, a funcionalidade e os graus de capacitação espermática em amostras seminais bovinas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de Percoll®. Por fim, correlacionar as taxas de produção in vitro de embriões desses touros com as categorias indicadoras de capacitação espermática avaliadas pelo ensaio de CTC e assinatura de Zinco.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Um bom resultado na produção *in vitro* de embriões depende de uma boa qualidade dos gametas utilizado (LECHNIAK; PERS-KAMCZYC; PAWLAK, 2008) e tanto o oócito quanto o espermatozoide tem grande importância para um bom desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER.; HUNTRISS, JOHN D.; KRAWETZ, 2004). Por isso, as análises espermáticas são de extrema importância para selecionar espermatozoides melhores para a fecundação.

### 2.1 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

As análises de qualidade de sêmen são utilizadas para selecionar animais e para indicar o potencial de fertilidade do macho (GRAHAM; MOCÉ, 2005), no entanto a avaliação de um atributo espermático isolado não fornece resultados fidedignos para comprovar a sua fertilidade (HOLT; VAN LOOK, 2004; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). Já a associação da realização de várias análises espermáticas pode sugerir, com maior acurácia, o potencial de fertilidade do reprodutor (GARNER et al., 1986; ARRUDA et al., 2011).

As avaliações seminais mais comuns e as mais utilizadas são motilidade, concentração, vigor e morfologia espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; VEGA, 2013). Para que o espermatozoide bovino chegue ao local de fecundação é fundamental que ele possua motilidade (BERLINGUER et al., 2009). Este atributo espermático pode ser avaliado de modo subjetivo em microscopia óptica (VINCENT et al., 2014) ou pelo sistema computadorizado (CASA), que com uma maior consistência e precisão fornece a análise de vários parâmetros da cinética espermática (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, 2002; BRITO, 2010).

A concentração e o vigor espermático são avaliados em microscopia óptica, sendo a concentração, rotineiramente, realizada por meio da câmara de Neubauer e o vigor entre lâmina e lamínula. A avaliação da morfologia espermática tem uma grande importância já que influencia diretamente nos índices reprodutivos (AMANN; MORTIMER, 2000; GILLAN et al., 2008). A morfologia espermática pode ser avaliada em microscopia óptica utilizando técnicas de esfregaço com eosina-nigrosina e câmara úmida em formol salino (FRENEAU et al., 2010; ARRUDA et al., 2015), por

microscopia eletrônica (BARTH; OKO, 1992) e pelo sistema computadorizado (ASMA) (BOERSMA; RASSHOFER; STOLLA, 2001).

A análise dos atributos espermáticos utilizando sondas fluorescentes realizadas em citometria de fluxo é muito utilizada atualmente em laboratórios de pesquisa (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). Essa técnica permite associar várias sondas, permitindo a avaliação simultânea dos atributos espermáticos (ARRUDA et al., 2011).

A avaliação da membrana plasmática é de extrema importância, pois exerce um papel importante na manutenção da funcionalidade espermática (HARRISON; VICKERS, 1990). A sonda fluorescente utilizada para a avaliação da integridade da membrana plasmática é o iodeto de propídio (PI) (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005) que entra na célula espermática através de alterações na membrana e se adere ao DNA indicando membranas lesionadas (PEÑA et al., 2003).

Outra avaliação importante realizada por sonda fluorescente é a do potencial de membrana mitocondrial. A mitocôndria possui como principal função a produção de ATP, por meio da fosforilação oxidativa, energia essa utilizada para o movimento do flagelo do espermatozoide (GRAVANCE et al., 2000; PIOMBONI et al., 2012), estando diretamente ligada à motilidade espermática (GARNER et al., 1997). Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial em espermatozoide a sonda fluorescente mais utilizada é a 5,5',6-6'-Tetrachloro-1,1',3,3' Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1), devido a capacidade de identificar um alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (GRAVANCE et al., 2000; AMARAL et al., 2013). Em um estudo realizado por Sousa et al. (2011), os autores indicaram uma correlação positiva entre a alta fertilidade e as subpopulações de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial. Durante a fosforilação oxidativa, a mitocôndria produz elétrons que induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AITKEN et al., 2012a; AMARAL et al., 2013), sendo esses essenciais nos processos de capacitação espermática e reação acrossomal, porém em níveis altos podem causar um estresse oxidativo (AITKEN; BAKER, 2006; PEÑA, 2015).

As ROS, apesar de serem produzidos pela mitocôndria, quando acumuladas podem lesionar sua própria estrutura, causar danos no DNA, prejudicar a função espermática a até interferir na fertilidade (AITKEN; BAKER, 2006; AITKEN et al.,

2012a; AITKEN, 2017). Para a avaliação do estresse oxidativo em espermatozoides pode ser utilizado a sonda fluorescente CellROX™ green que emite uma fluorescência verde quando se liga ao DNA e identifica a existência de radicais livres (SOLLINGER et al., 2014; DE CASTRO et al., 2016).

## 2.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões é uma importante ferramenta de aprimoramento genético animal, pois aumenta a intensidade e a pressão de seleção, quando reduz o intervalo entre gerações (TANEJA et al., 2000; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Propicia também, a reprodução de fêmeas de alto valor genético, ou que porventura sejam portadoras de patologias reprodutivas adquiridas (FABER et al., 2003). A técnica pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes (GOODHAND, 1999; TANEJA et al., 2000; DAYAN, 2001; RENESTO, 2004), possibilitando inclusive, a utilização de bezerras como doadoras de oócitos em programas de melhoramento (TANEJA et al., 2000).

A PIVE consiste na preparação de gametas em laboratório para geração do zigoto, que será cultivado até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado e posterior transferência para uma receptora que irá gestar esse embrião (GONÇALVES et al., 2007). A técnica está relacionada a uma série de procedimentos integrados, que vão desde o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, aspiração folicular guiada por ultrassonografia, maturação e fecundação dos oócitos e cultivo dos embriões *in vitro* (RUIZ et al., 1998; GONÇALVES et al., 2007) até a transferência para as receptoras (RIZOS et al., 2008) ou para a congelação, se for o caso (DODE; LEME, 2013).

Os oócitos podem ser obtidos por meio do fatiamento dos ovários (*slicing*) ou aspiração folicular com agulha e seringa ou bomba a vácuo (WANI et al., 2000; BERNARDI, 2005). Após a obtenção, os oócitos são classificados em diferentes graus (SHIRAZI; SHAMS-ESFANDABADI; HOSSEINI, 2005), sendo os de melhor grau, dentro de uma escala de 1 a 4, são destinados à maturação *in vitro* pelo período de 22 a 24 horas (RUIZ et al., 1998; THOMPSON, 2000; GONÇALVES et al., 2002). Ao fim do período de maturação, inicia-se a fecundação *in vitro* (FIV), ou seja, o co-cultivo de espermatozoides com oócitos, momento em que ocorre a combinação do material

genético dos gametas e a formação do zigoto (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008; PARRISH, 2014). A FIV é realizada por um período de 18-22h, a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2008).

No processo de fecundação *in vitro* (FIV), são usados espermatozoides de palhetas de sêmen congelado, que passam por um processo de preparo. Durante a passagem dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea ocorre uma seleção daqueles mais capacitados a realizar a fecundação (HALLAP et al., 2004). Já *in vitro*, na etapa da FIV, é necessário que haja a seleção desses espermatozoides com melhor qualidade (HENKEL; SCHILL, 2003) e as técnicas mais utilizadas são a de *swim-up* e a de gradiente de densidade de sílica coloidal denominado Percoll® (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995; LEE et al., 2009). Após a preparação do sêmen ocorre a co-incubação dos espermatozoides com os oócitos por 18 a 20 horas para ocorrer a fecundação (SIQUEIRA et al., 2018).

Passado o período de incubação dos gametas, os presumíveis zigotos são submetidos a um processo de desnudação para remoção do excesso de células do *cumulus*, que pode ser realizado mecanicamente, por meio de pipetagens sucessivas (SIQUEIRA et al., 2018) ou vórtex (GOISSIS; CIBELLI, 2014). O cultivo *in vitro* é a etapa de desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período que ocorrem eventos importantes como a ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e diferenciação celular entre trofotoderma e massa celular interna (LONERGAN et al., 1999; HOSHI, 2003).

Segundo Thompson (2000), o desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo, porém outros pesquisadores realizam avaliações em diferentes dias cultivo, objetivando avaliar a taxa de clivagem no 3º dia (SIQUEIRA, et al., 2018) ou no 4º dia (GOISSIS e CIBELLI 2014), quando se opta ou não pela suplementação do meio de cultivo.

No 7º dia de cultivo *in vitro* é feita a seleção e a avaliação final dos embriões para a transferência à fresco ou para a congelação (THOMPSON, 2000; DODE; LEME, 2013).



### 2.3 GRADIENTE DE DENSIDADE PERCOLL®

O método de seleção dos espermatozoides apontado como mais adequado e utilizado em bovinos é o gradiente de densidade Percoll® (MORTIMER, 2000; MENDES et al., 2003; O' MEARA et al., 2008). É um meio para centrifugação de densidade composto de partículas de sílicas coloidal com um diâmetro de 15 a 30 nm, revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) com densidade de 1,13g/ml e peso molecular  $6 \times 10^6$  (PERTOFT et al., 1978; PERTOFT, 2000; SAMARDZIJA et al., 2006). Essa característica coloidal impossibilita que haja uma difusão do meio para o interior da célula espermática, evitando assim um estresse osmótico (LESSLEY; GARNER, 1983). Os espermatozoides móveis recuperados após a centrifugação ficam na fração inferior e na fração superior encontra-se os espermatozoides mortos, diluidor, detritos celulares e plasma seminal (AVERY; GREVE, 1995). A rápida sedimentação do espermatozoide no gradiente de Percoll® se dá pela característica de pouca viscosidade (PERTOFT et al., 1978).

Estudos demonstraram que o Percoll® resultou em uma maior porcentagem de células com motilidade progressiva (SUZUKI et al., 2003) e acrossoma intacto (SOMFAI et al., 2002). Além disso, Somfai et al. (2002) reportou uma maior concentração espermática em amostras seminais de bovinos submetidas a esse gradiente. Um estudo com espermatozoides de humanos relatou maior quantidade de espermatozoides normais após a centrifugação no gradiente de Percoll® (PRAKASH et al., 1998), sendo que a remoção é de principalmente espermatozoides com defeitos de cauda e peça intermediária (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997). Cesari et al. (2006) relaram uma maior taxa de blastocisto oriundos de sêmen de touros selecionados pelo gradiente Percoll®.

Sabe-se que o gradiente de densidade Percoll® separa as amostras seminais dos componentes do diluidor, debris celulares, bactérias e vírus (HENKEL; SCHILL, 2003), porém não está claro se ocorre a seleção de espermatozoides maduros e imaturos. Alguns estudos relatam que o Percoll® seleciona espermatozoides capacitados ou inicia o processo de capacitação (OSHIO, 1988; SAKKAS et al., 2015).

## 2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Após a ejaculação, os espermatozoides de mamíferos não estão preparados para fecundar o oócito, ele adquire essa capacidade durante o percurso dentro do trato reprodutivo da fêmea (CHANG; PINCUS, 1951; MORTIMER, 2000). Para ele adquirir essa capacidade fecundante ele precisa passar por um processo denominado de capacitação espermática (JAGAN MOHANARAO; ATREJA, 2011), que é caracterizada por mudanças funcionais e estruturais nas células espermáticas (GEORGADAKI et al., 2016). Essas mudanças estão diretamente relacionadas com a permeabilidade e a estrutura da membrana plasmática, alteração na concentração iônica intracelular, metabolismo e motilidade dos espermatozoides (YANAGIMACHI; USUI, 1974).

A capacitação espermática se inicia com o efluxo do colesterol da membrana plasmática do espermatozoide desencadeado pela proteína albumina, alterando a permeabilidade e permitindo o influxo de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) para dentro da célula. Esses influxos induzem a ativação de mensageiros secundários intracelulares (TULSIANI; ZENG; ABOU-HAILA, 2007; ABOU-HAILA; TULSIANI, 2009). A retirada do colesterol e o influxo dos íons induz uma cascata de sinalização e vários eventos que resultam na fosforilação da proteína tirosina e na hiperativação do espermatozoide (NAZ, 2004). Outro evento que ocorre no início da capacitação espermática é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que produz uma substância chamada oxisterol, que auxilia na remoção do colesterol que é o evento inicial de todo o processo (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017).

Durante o trajeto do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea, esta célula ao alcançar oviduto entra em contato com diversas moléculas presentes no fluido ovidutário, como a albumina e a heparina que induzem a capacitação espermática (HOLT; FAZELI, 2010; LAMY, 2015; CHANG; PINCUS, 1951). Quando o processo de fecundação é *in vitro*, essas substâncias não estão presentes, por isso é preciso mimetizar esse processo para que aconteça da forma mais adequada. No momento da fecundação *in vitro*, para que ocorra a capacitação espermática, são utilizados agentes capacitantes como heparina e albumina que são encontrados no fluido uterino (PARRISH, 2014; OKABE, 2018).

Existem vários métodos descritos na literatura para a avaliação da capacitação espermática em seus diferentes momentos sendo descritos como precoces e tardios.

Para a avaliação dos eventos prematuros da capacitação espermáticas pode ser utilizado a sonda fluorescente Merocianina 540 (M540), a qual aumenta sua intensidade quando há desordens lipídicas na membrana plasmática do espermatozoide (GADELLA et al., 2001; HALLAP et al., 2006). Outro método utilizado para avaliação precoce é o uso do antibiótico polieno macrolídeo Fillipin, que se liga ao colesterol emitindo uma fluorescência azul (MACÍAS-GARCÍA et al., 2015). A avaliação da capacitação pela clortetraciclina é muito utilizada (WARD; STOREY, 1984; DE CASTRO et al., 2016) sendo que esta se liga ao cálcio livre presente na célula espermática emitindo uma fluorescência amarela (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017). Um evento mais tardio que ocorre na capacitação espermática é a fosforilação da tirosina que pode ser detectado pelo método de imunofluorescência (LEEMANS et al., 2014). Além desses métodos, recentemente foi descrito na literatura um método de avaliação da capacitação espermática pela utilização de uma sonda fluorescente que detecta os íons de zinco presente no espermatozoide (KERNS et al., 2018).

## 2.5 ZINCO

O zinco desempenha diversas funções biológicas e está presente em órgãos como coração, pele, pulmão, rim e olhos, sendo assim muito importante para a saúde. O íon zinco auxilia no sistema imunológico atuando no crescimento e na proliferação das células (ALLOUCHE-FITOUSSI; BREITBART, 2020). Além disso, se faz necessário em vários eventos de organização do DNA e RNA (CHVAPIL, 1973). Na fertilidade masculina o zinco desempenha um papel importante, estando presente em altas concentrações no plasma seminal, atuando diretamente na espermatogênese (KERNS; ZIGO; SUTOVSKY, 2018).

Um estudo revelou que homens férteis possuem maior quantidade de ZN no plasma seminal comparado a homens inférteis (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009). Já outro relato na literatura associou a baixa concentração de zinco no plasma seminal, decorrente do acidente de radiação da ucrânia, com a infertilidade em humanos (ANDREYCHENKO et al., 2016). Não só relacionado a infertilidade, o ZN, em altas concentrações no plasma seminal foi relacionado com maior porcentagem

de espermatozoide morfologicamente normais em um ejaculado (COLAGAR; MARZONY; CHAICHI, 2009).

O zinco tem grande importância em vários aspectos. Estudos revelaram que a suplementação com  $Zn^{2+}$  na dieta tem efeitos positivos na reprodução de machos por aumentar a concentração espermática em carneiros (UNDERWOOD; SOMERS, 1969), impossibilitar a capacitação prematura, inibindo os canais HV1 do espermatozoide (KERNS et al., 2018), aumentar os níveis séricos de testosterona (PRASAD et al., 1996) e aumentar a integridade de membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides de bodes (NARASIMHAIAH et al., 2018).

Além de todas as mudanças que ocorrem na capacitação espermática mencionadas acima também ocorre a remoção dos íons de zinco da célula espermática durante esse processo (ANDREWS; BAVISTER, 1989). Além disso, entende-se que o efluxo de zinco é essencial para que ocorra o influxo de cálcio que é a chave e o gatilho para que ocorra a capacitação espermática (YANAGIMACHI; USUI, 1974). Os íons de zinco ainda não foram bem esclarecidos em espermatozoides de mamíferos, mas sabe-se que regula negativamente o canal de prótons HVC1, responsável por regular o pH intracelular e pela entrada de cálcio via canal CATSPER (TARDIF; DUBÉ; BAILEY, 2003; LISHKO et al., 2010).

Segundo Chvapil. (1973) o zinco está presente em grandes quantidades no testículo, próstata e sêmen de mamíferos, podendo desempenhar um papel importante na reprodução. O zinco tem efeito inibitório na capacitação espermática e está relacionado com a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide (AONUMA; OKABE; SCIENCES, 1978). Em altos níveis são responsáveis por manter os espermatozoides em um estado quiescente e manter a estabilidade da membrana durante seu armazenamento no epidídimo (HUACUJA, 1973; MANN, 1964). O zinco tem um papel importante na inibição da motilidade espermática, evidenciado pelo aumento da motilidade progressiva dos espermatozoides quando do uso de quelantes de zinco (WROBLEWSKI; SCHILL; HENKEL, 2003). Um estudo demonstrou que quando adicionado ao meio de FIV o zinco promove o bloqueio da fecundação (STEPHENSON; BRACKETT, 1999), inibindo a motilidade e a reação acrossomal nos espermatozoides (RIFFO; LEIVA; ASTUDILLO, 1992).

O zinco age como um segundo mensageiro no processo de obtenção da motilidade, atuando com uma proteína de membrana chamada ZIPT-7.1 que quando ativa é responsável pela liberação do zinco no meio intracelular das organelas. Altos

níveis de zinco no citoplasma faz com que na ausência de transcrição, ocorra a ativação de proteínas intracelulares reguladas pelo zinco, que agem na modulação da aquisição da motilidade (CHU, 2018). Um estudo demonstrou que a deleção de um homólogo de ZIPT-1 pode ser uma causa de esterilidade em homens (DIETRICH; SCHNEIDER; KORNFELD, 2017).

Existe um evento excitótico induzido pelo primeiro espermatozoide que fecunda o oócito, chamado de “Zinc Spark”. Nesse, o oócito libera bilhões de íons de zinco formando um escudo de zinco extracelular, prejudicando a sinalização de zinco nos espermatozoides em volta do oócito, impedindo a fecundação destes, o que diminui a polispermia (QUE et al., 2015, 2017). Esse evento pode decapacitar os espermatozoides que estão ligados à zona pelúcida do oócito ou aqueles que estão presente no espaço perivitelínico impedindo que os mesmos cheguem a fecundar o oócito (KERNS et al., 2018).

Kerns e colaboradores. (2018) relacionaram a assinatura de zinco como um indicador precoce de capacitação espermática, sendo um candidato de qualidade e fertilidade do espermatozoide. Neste trabalho, os autores, identificaram 4 sinalizações de zinco, demonstrando diferentes localizações deste íon nas estruturas espermáticas, relacionando estas às diferentes fases da capacitação espermática. Essas localizações estão associadas a importantes eventos relacionados a obtenção da capacidade fecundante do espermatozoide, indicando os momentos de não capacitação, hiperativação, alterações no acrossoma e exocitose acrossomal (KERNS et al., 2018). Além disso outro estudo desse mesmo grupo identificou distintas assinaturas de zinco nas diferentes frações do ejaculado de cachorro, mostrando a presença de zinco no decorrer do processo de capacitação. A fração pré-rica apresentou maior quantidade de espermatozoides não capacitados (assinatura 1), enquanto que as outras frações rica e pós rica a prevalência é de espermatozoides em capacitação (assinatura 2) (KERNS et al., 2020).

### 3 HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que o gradiente de densidade Percoll® promove a separação das células capacitadas das não capacitadas, correlacionando positivamente com a produção *in vitro* de embriões, devido à sincronia de eventos na FIV.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

O objetivo geral desse estudo foi avaliar os efeitos que o gradiente de densidade Percoll® causam na célula espermática de amostras de sêmen de bovinos. E também, correlacionar as taxas de produção *in vitro* de embriões desses touros com as categorias indicadoras de capacitação espermática avaliadas pelo ensaio da Clortetraciclina CTC e pelas assinaturas de Zinco.

### 4.2 ESPECÍFICOS

Este estudo teve como objetivos específicos avaliar:

- a) a integridade da membrana plasmática, o potencial de membrana mitocondrial e o estresse oxidativo em espermatozoides, por citometria de fluxo em amostras espermáticas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de densidade Percoll®.
- b) a motilidade por sistema computadorizado (CASA) em amostras espermáticas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de Percoll®.
- c) a capacitação espermática por meio do ensaio da Clortetraciclina em amostras espermáticas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de Percoll®.
- d) a capacitação espermática por meio da assinatura de Zinco em amostras espermáticas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de Percoll®.
- e) a produção *in vitro* de embriões com amostras espermáticas bovinas submetidas (**PÓS**) ao gradiente de Percoll® e correlacionar as taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário, com o status de capacitação espermática.

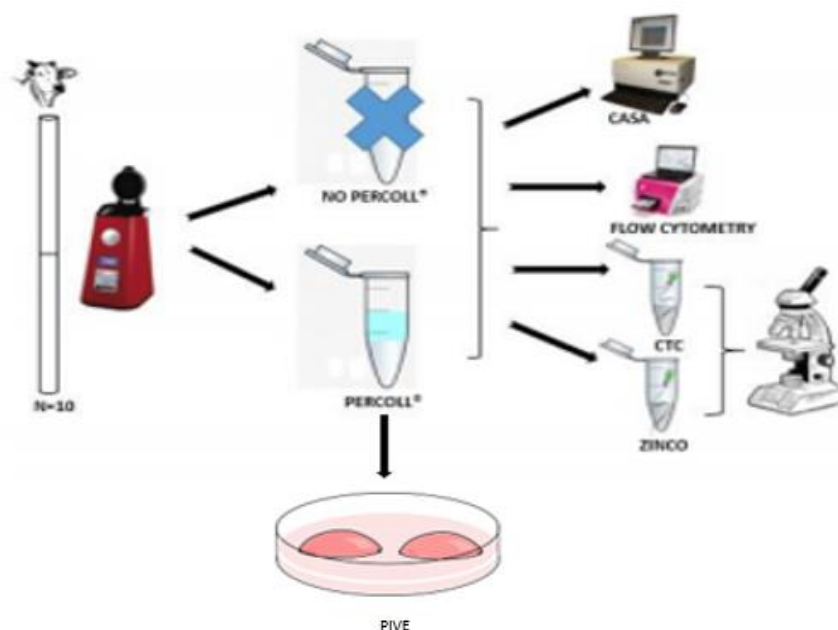
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP - Protocolo n° 5147101018). O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia do Espermatozoide do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP. Os reagentes químicos e soluções utilizados em cada etapa do experimento foram adquiridos da Sigma- Aldrich e os demais serão descritos no texto.

### 5.1 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

As amostras de sêmen utilizadas nesse estudo foram doadas pela empresa ST Repro®. Foram utilizadas palhetas de sêmen de 10 touros, selecionados de modo aleatório, da raça Nelore do portfólio da empresa. Cada amostra de sêmen foi processada com o intuito de atender os dois grupos experimentais: o grupo **PRÉ** no qual avaliações seminais foram realizadas sem a passagem do sêmen no gradiente de Percoll®; e o grupo **PÓS**, cujas avaliações foram realizadas após a processamento em gradiente de densidade de Percoll® (45 e 90%) conforme a figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental.



Fonte: Simões (2021)



## 5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

Uma palheta de cada touro foi descongelada a 37°C por 30 segundos, sendo metade da dose destinada para o processamento referente ao grupo **PRÉ**, e a outra metade para o grupo **PÓS**.

O preparo das amostras do grupo **PRÉ** consistiu na retirada do diluidor por meio de lavagem. Para isso, após a descongelação do sêmen, metade da dose foi depositada em microtubo de 1,5 mL Eppendorf® contendo 1 mL de meio TL-SEMEN (100mM NaCL, 3,1 mM KCL, 0,4 mM MgCL<sub>2</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1µM CaCL<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O, 0,0005g Phenol Red, 21,6 mM Ácido láctico syr., 10 mM HEPES). As amostras foram então submetidas à centrifugação a 200xg por cinco minutos a 37°C. Após a centrifugação, 100 µl do sedimento foram recuperados e submetidos a uma segunda centrifugação em 1 mL de meio TL-SEMEN à 100xg por cinco minutos a 37°C. Por fim, 80 µl do sedimento foram recuperados e mantidos a 37°C em banho seco para prosseguimento das avaliações espermáticas.

O grupo **PÓS** consistiu na passagem do sêmen em gradiente de Percoll®. Em microtubo, pré aquecido a 37°C foi preparado o gradiente de densidade Percoll® (90% e 45% em meio TL-SEMEN). Sobre o gradiente foi depositado cuidadosamente o conteúdo de metade da palheta de sêmen, e posteriormente submetida à centrifugação a 6600xg por cinco minutos. Após a centrifugação, 100 µl do sedimento foram recuperados e o volume adicionado em um novo microtudo com 1 mL de TL-SEMEN para nova centrifugação a 1100xg por 3 minutos. Cerca de 80 µl do sedimento pós centrifugação foram obtidos e mantidos a 37°C em banho seco, para as avaliações espermáticas.

Após passagem ou não pelo gradiente Percoll®, foi realizada a avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer. A concentração das amostras foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> espermatozoides por ml para as avaliações de citometria, CASA e status de capacitação por meio da clortetraciclina (CTC); enquanto para análise do status de capacitação por meio da avaliação da assinatura de zinco, uma alíquota com concentração ajustada de 40x10<sup>6</sup> de espermatozoides por ml foi preparada.

### 5.3 ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS

As avaliações por citometria de fluxo foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, EUA) do Laboratório de Biologia do Espermatozoide do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP. Os dados fornecidos foram analisados pelo software FlowJo v10.2 (Flow Cytometry Analysis Software- Tree Star Inc., Asland, USA) (APÊNDICES 1, 2 e 3).

Todas as amostras do grupo **PRÉ** e **PÓS** dos 10 touros foram avaliadas quanto à integridade das membranas plasmática (PI), potencial de membrana mitocondrial (JC1), conforme descrito por Siqueira et al. (2018) e estresse oxidativo (CELLROXTM green) conforme descrito por De Castro et al. (2016a).

A avaliação da motilidade espermática computadorizada foi realizada pelo sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA - Hamilton Thorne IVOS, v.12.2, Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP).

#### 5.3.1 Integridade de membrana plasmática

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizado a sonda fluorescente PI (iodeto de propídio – 3,8 Diamino -5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6phenylphenanthridinium diiodide) segundo a metodologia descrita em Siqueira et al. (2018). Cerca de 7,5 µl de sêmen (187.500 células) foram incubados com 0,5 µl de 6 µM em 30 µl de meio TL-SEMEN a 37°C por 5 minutos. No momento da leitura em citômetro de fluxo foi adicionado 300 µl de PBS nas amostras. Foram consideradas duas populações: espermatozoides com membrana plasmática intacta (MPI); e espermatozoides com membrana plasmática lesada (MPL).

#### 5.3.2 Potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro,1 ,3 ,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), segundo a metodologia utilizada por Siqueira et al. (2018). Cerca de 7,5 µl de sêmen (187.500 células) foram incubados com 0,5 µl de JC-1 (concentração final 5

$\mu\text{M}$ ) em 30  $\mu\text{l}$  do meio TL-SEMEN a 37° C por 5 minutos. No momento da leitura em citômetro de fluxo foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de PBS nas amostras. Foram obtidas três classificações: Alto - espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial; Intermediário - com potencial de membrana mitocondrial intermediário; e Baixo - espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial.

### 5.3.3 Estresse Oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo intracelular foi realizado com o uso da sonda fluorescente CellROX green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), seguindo a metodologia descrita por Castro et al. (2016a). Cerca de 7,5  $\mu\text{l}$  de sêmen (187.500 células) foram incubados com 1,85  $\mu\text{l}$  da sonda CellROX<sup>TM</sup> green (concentração final 5  $\mu\text{M}$ ) em 30 $\mu\text{l}$  de meio TL SEMEN a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, houve incubação com 0,6  $\mu\text{l}$  de PI (concentração final de 0,6  $\mu\text{M}$ ) por mais 10 minutos. No momento da leitura em citômetro de fluxo foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de PBS nas amostras. Foram obtidas quatro categorias espermáticas de acordo com a integridade de membrana plasmática e estresse oxidativo: membrana íntegra sem estresse (CellROX-/PI-), membrana íntegra com estresse (CellROX+/PI), membrana lesada sem estresse (CellROX-/PI+) e membrana lesada com estresse (CellROX+/PI+).

## 5.4 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA

Para avaliação da motilidade espermática por meio de sistema computadorizado (CASA) Hamilton Thorne IVOS, v.12.2, do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, cerca de 5  $\mu\text{l}$  das amostras foram depositadas entre lâmina e lamínula pré aquecidas a 37°C. Foram utilizados os valores da média de quatro campos analisados para os parâmetros de motilidade avaliados abaixo descritos:

Motile - Motilidade total (%).

VAP - Velocidade de trajeto ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme, desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática. É a velocidade média da trajetória do espermatozoide.

VSL - Velocidade progressiva ( $\mu\text{m/s}$ ): é a distância, considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória, dividida pelo tempo decorrido.

VCL - Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): é a distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem. É a velocidade da trajetória real do espermatozoide.

ALH - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça ( $\mu\text{m}$ ): corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento.

BCF - Frequência de batimentos do flagelo (Hz): determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção.

STR - Retilinearidade (%): é a medida do afastamento médio da trajetória da célula espermática, considerando-se uma linha reta. Calculado pela relação entre  $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$ . Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

LIN - linearidade (%): é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a razão entre  $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$ .

Velocidade do espermatozoide: Rapid - porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (%), Medium - porcentagem de espermatozoides com velocidade média (%), Slow – porcentagem de espermatozoides com velocidade lenta (%), Progress - porcentagem de espermatozoides com velocidade progressiva (%) e Static - porcentagem de espermatozoides estáticos (%)

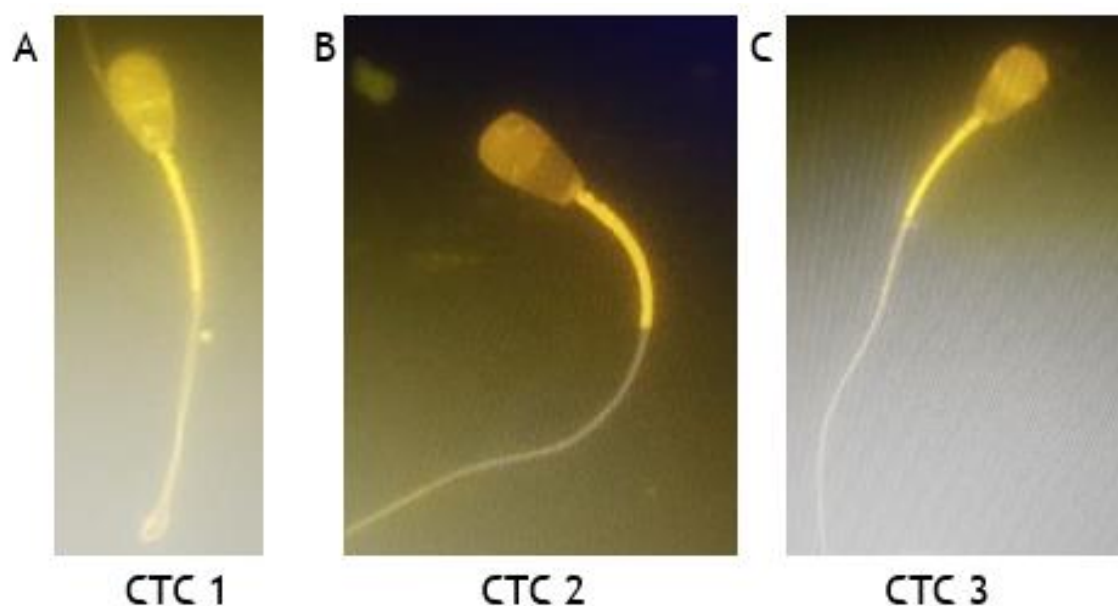
## 5.5 AVALIAÇÃO DO STATUS DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

### 5.5.1 Ensaio de Clortetraciclina

Para a avaliação do status de capacitação espermática foi utilizada a técnica padrão com a sonda Clortetraciclina (CTC), segundo a metodologia utilizada por Castro et al. (2015). A sonda de CTC ( $38 \mu\text{M}$ ) foi previamente diluída em solução estoque (TRIS 20 mM, NaCl 130mM, and L-cisteína 4mM). Posteriormente, cerca de  $15 \mu\text{l}$  das amostras de sêmen ( $25 \times 10^6$  de espermatozoides por ml) foram adicionadas à  $20 \mu\text{l}$  da sonda CTC e  $5 \mu\text{l}$  de paraformaldeído 3,7%, e mantidas a  $37^\circ\text{C}$ . Cerca de  $5 \mu\text{l}$  da amostra foi depositada entre lâminas e lamínulas para avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus IX80) utilizando o filtro DAPI de coloração

azul. Foram avaliadas cerca de 200 células com o aumento de 1000X, sob imersão, e classificadas de acordo com Kato e Nagao (2015): CTC 1 - não capacitado (fluorescência amarela uniforme em toda a cabeça), CTC 2 - capacitado (fluorescência amarela apenas na região acrossomal) e CTC 3 - reagido (banda fluorescente intensa na região equatorial, indicando que a reação acrossomal já aconteceu), exemplificado na figura 2.

Figura 2: Microscopia de epifluorescência da avaliação de CTC em espermatozoides bovinos.



Fonte: Simões (2021)

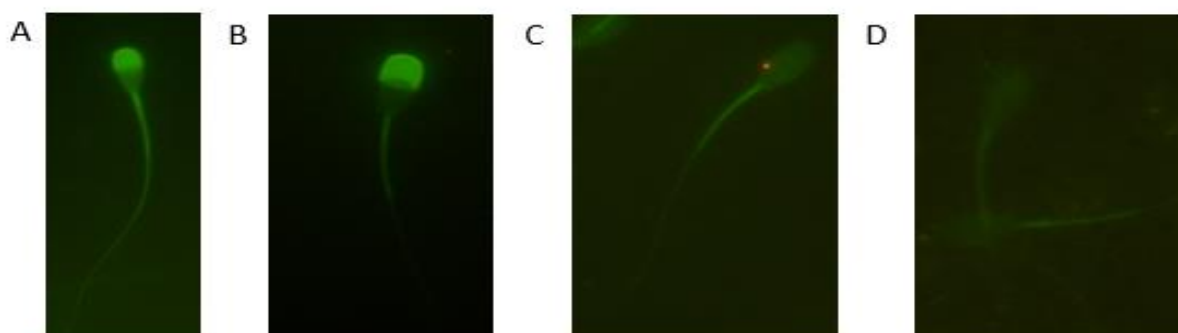
Legenda: A: CTC 1 (Classificação 1 - não capacitado) fluorescência amarela uniforme em toda a cabeça. B: CTC 2 (Classificação 2- capacitado) fluorescência amarela apenas na região acrossomal. C: CTC 3 (Classificação 3- reagido) banda fluorescente intensa na região equatorial, indicando que a reação acrossomal já aconteceu). Magnificação de 1000X

### 5.5.2 Assinatura de Zinco

Para a avaliação das assinaturas de zinco do espermatozoide, com o intuito de avaliar também o status de capacitação espermática foi utilizada a sonda para o zinco denominada FluoZin™-3 AM (FZ3 – ThermoFisher), segundo a metodologia descrita por Kerns et al. (2018). Para essa análise foram utilizados  $40 \times 10^6$  de espermatozoides por ml. A sonda de zinco foi pré diluída em DMSO e 0,5  $\mu$ l da sonda foi incubada com 50  $\mu$ l da amostra de sêmen por 30 minutos. Após a incubação, 10  $\mu$ l da amostra foram depositadas entre lâminas e lamínulas e avaliadas em microscopia de fluorescência

(Olympus IX80) utilizando o filtro FITC de coloração verde. Foram contadas 200 células, em aumento de 400X e classificados quanto a localização celular do zinco: Assinatura ZN 1 - não capacitado (fluorescência localizada em toda estrutura celular), Assinatura ZN 2 - em capacitação (fluorescência localizada na peça intermediária e cabeça), Assinatura ZN 3 – capacitado com fluorescência restrita a peça intermediária, e Assinatura ZN 4 - capacitado sem fluorescência, conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3: Microscopia de epifluorescência da assinatura de zinco em espermatozoides de touro. A presença de  $Zn^{2+}$  apenas na peça intermediária.



Fonte: Simões (2021)

Legenda: A - ZN 1 (Assinatura 1- não capacitado) presença de  $Zn^{2+}$  na cabeça e na cauda inteira do espermatozoide. B: ZN 2 (Assinatura 2- em capacitação) presença de  $Zn^{2+}$  na cabeça do espermatozoide e na peça intermediária. C: ZN 3 (Assinatura 3 - espermatozoide capacitado) presença de  $Zn^{2+}$  apenas na peça intermediária. D: ZN 4 (Assinatura 4- membrana plasmática remodelada) sem presença de  $Zn^{2+}$ . Magnificação de 400x.

## 5.6 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)

A PIVE foi realizada como descrito em Siqueira et al. (2018) e seis replicatas de PIVE foram realizadas. Foram utilizados ovários coletados em matadouros comerciais e transportados para o laboratório em solução salina (0,9%) à 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina pré-aquecida à 37°C e aspirados utilizando agulhas 18G e seringas de 5ml. Foram aspirados somente folículos de diâmetros entre 2 e 8 mm e os oócitos foram pré-selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) quanto a homogeneidade e integridade do citoplasma e compactação da camada de células do *cumulus*. Os oócitos foram lavados três vezes no meio HH (Anexo 1) e três vezes no meio MIV [TCM199 Bicarbonato - Gibco®, suplementado com 10% de SFB - Gibco®, 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH-Follitropin-V (Vetrepharm, Inc., Belleville, ON,

Canada), 50 µg/ml de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor Laboratories, Calier, Spain) e 1 µg/ml de 17β-estradiol hidrossolúvel]. Foram colocados 20 a 30 oócitos por gota de 90 µl para maturação *in vitro* em incubadora a 38,5°C, com 100% de umidade, em 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 22-24h.

Após a maturação, os oócitos foram lavados três vezes em meio HH e três vezes em meio FIV GOTA [TL-Stock (NaCL, KCL, MgCL<sub>2</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCL<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O Ácido Lático – Sigma®) acrescidos de BSA livre de ácidos graxos Sigma®, piruvato, gentamicina e agentes capacitantes: heparina, penicilina, epinefrina e hipotaurina], sendo colocados 20 a 30 oócitos por gota de 90 µl, sob óleo mineral. Para a FIV, o mesmo processamento do sêmen submetido ao gradiente de Percoll®, descrito do item 5.2 foi realizado. As amostras de sêmen, de cada touro, foram ajustadas para a concentração de 25x10<sup>6</sup> de espermatozoides por ml e cada gota foi inseminada com 4 µl da amostra (100.000 espermatozoides móveis por gota). As placas foram mantidas em incubadoras à 38,5°C com alta umidade e 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 20 horas, sendo considerado D0 o dia da FIV.

No D1, os presumíveis zigotos foram lavados por três vezes em meio HH, sendo removido mecanicamente as células do *cumulus* por pipetagens sucessivas. Os presumíveis zigotos foram colocados em meio de cultivo KSOM (Milipore, MR 020P-5d), acrescido com BSA, gentamicina, aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais e mantidos e cultivados por 8 dias em incubadora sob uma atmosfera de gases controlados com 5% CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> a 38,5°C e alta umidade.

No terceiro dia de cultivo (D3) foi removido 30 µl do meio de cada gota e adicionado mais 30 µl de KSOM com 10% de soro fetal bovino (SFB), com concentração final 5% de SFB em cada gota. Nesse período foi avaliada a taxa de clivagem que consiste na contagem das estruturas clivadas/total de estruturas cultivadas.

Do quinto dia de cultivo (D5) foi adicionado 30 µl de KSOM com 5% de SFB em cada gota de cultivo e no oitavo dia (D8) foram realizadas as taxas de blastocisto e taxa de desenvolvimento embrionário (número de blastocistos produzidos/estruturas clivadas).

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa SAS System (SAS Institute, Cary, NC, USA). A comparação dos dois grupos experimentais (**PRÉ e PÓS**) foi realizada pelo procedimento TTest, sendo considerado o nível de significância de 5%.

O procedimento Spearman foi utilizado para a análise de correlação entre as variáveis do status de capacitação espermática e as taxas de produção *in vitro* de embriões no grupo **PÓS**; e entre as variáveis para avaliação dos atributos espermáticos e o status de capacitação espermática no grupo **PRÉ** no grupo **PÓS**, separadamente.

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).



## 6 RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE DOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Não foram observadas diferenças entre o grupo **PRÉ** e **PÓS** para as variáveis relacionadas à integridade da membrana plasmática, assim como para as diferentes populações de espermatozoides avaliados para o potencial de membrana mitocondrial (Tabela 1). Para avaliação da marcação do estresse oxidativo intracelular pela sonda CellROX green, o grupo **PÓS** apresentou maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e com marcação positiva para estresse oxidativo comparado ao grupo **PRÉ**,  $26,06 \pm 4,89$  e  $13,53 \pm 2,36$ , respectivamente ( $p=0,03$ ). Não foram observadas diferenças nas outras categorias celulares para essa avaliação (Tabela 1).

Tabela 1 - Média da porcentagem e erro padrão da média para os atributos espermáticos avaliados por citometria de fluxo para os grupos **PRÉ** e **PÓS**, valores de  $p$ .

Variáveis	Grupo PRÉ (%)	Grupo PÓS (%)	$p$
Alto PMM	$23,22 \pm 2,17$	$25,58 \pm 4,60$	0,65
Baixo PMM	$37,75 \pm 6,06$	$27,60 \pm 6,12$	0,25
PMM Intermediário	$37,86 \pm 6,13$	$46,46 \pm 4,12$	0,11
MPL	$55,39 \pm 4,52$	$44,94 \pm 3,77$	0,09
MPI	$44,61 \pm 4,52$	$56,65 \pm 3,82$	0,38
CellROX+/PI+	$4,46 \pm 0,75$	$3,86 \pm 1,08$	0,66
CellROX-/PI+	$61,76 \pm 4,45$	$50,29 \pm 4,38$	0,08
CellROX+/PI-	$13,53 \pm 2,36^a$	$26,06 \pm 4,89^b$	<b>0,03</b>
CellROX-/PI-	$20,26 \pm 3,61$	$19,79 \pm 3,56$	0,92

Fonte: Simões (2021)

Legenda: PMM: Potencial de membrana mitocondrial; MP: Membrana plasmática lesada; MPI: Membrana plasmática íntegra; CellROX+/PI+: Membrana plasmática lesada e com estresse oxidativo; CellROX-/PI+: Membrana plasmática lesada e sem estresse oxidativo. CellROX+/PI-: Membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo; CellROX-/PI-: Membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA

Somente a variável índice de retilinearidade (STR) apresentou maior porcentagem para o grupo **PRÉ** comparado ao grupo **PÓS**,  $80,40 \pm 1,57$  e  $70,60 \pm 4,17$ , respectivamente ( $p=0,04$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos nas demais variáveis avaliadas pelo sistema CASA (tabela 2).

Tabela 2 - Média e erro padrão da média para as variáveis avaliadas pelo sistema computadorizado de motilidade (CASA) para os grupos PRÉ e PÓS, e valores de  $p$ .

Variáveis	Grupo PRÉ	Grupo PÓS	$p$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$100,77 \pm 4,07$	$89,21 \pm 4,69$	0,079
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	$84,22 \pm 4,49$	$68,81 \pm 6,10$	0,0571
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	$179,08 \pm 3,23$	$172,88 \pm 5,53$	0,346
ALH ( $\mu\text{m}$ )	$7,53 \pm 0,38$	$6,58 \pm 0,83$	0,32
BCF (Hz)	$35,96 \pm 1,62$	$37,86 \pm 1,26$	0,36
STR (%)	$80,40 \pm 1,57^a$	$70,60 \pm 4,17^b$	<b>0,04</b>
LIN (%)	$47,60 \pm 2,49$	$43,11 \pm 2,34$	0,21
MOTILE (%)	$21,80 \pm 2,76$	$24,60 \pm 7,43$	0,44
PROGRESS (%)	$11,30 \pm 2,19$	$10,30 \pm 4,28$	0,83
RAPID (%)	$13,90 \pm 2,48$	$12,30 \pm 5,37$	0,92
MEDIUM (%)	$1,98 \pm 0,27$	$2,60 \pm 0,85$	0,45
SLOW (%)	$5,90 \pm 0,60$	$8,60 \pm 1,83$	0,46
STATIC (%)	$78,20 \pm 2,76$	$75,40 \pm 7,43$	0,99

Fonte: Simões (2021)

Legenda: VAP: Velocidade média de percurso ( $\mu\text{m/s}$ ); VSL: Velocidade retilínea ( $\mu\text{m/s}$ ); VCL: Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ); ALH: Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ ); BCF: Frequência de batimento cruzado (Hz); STR: retilinearidade (%); LIN: linearidade (%); MOTILE: motilidade (%); PROGRESS: motilidade progressiva (%); RAPID: padrão rápido (%), MEDIUM: padrão médio (%); SLOW: padrão lento (%) e STATIC: padrão estático (%).

### 6.3 AVALIAÇÃO DO STATUS DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Para a avaliação do ensaio da CTC, o grupo **PÓS** apresentou maior porcentagem de espermatozoides categoria CTC 1 ( $20,64 \pm 3,97$  e  $4,70 \pm 1,97$ , respectivamente para **PÓS** e **PRÉ**,  $p=0,0032$ ) e menor porcentagem de espermatozoides na categoria CTC 3 ( $59,34 \pm 5,16$  e  $82,99 \pm 4,11$  respectivamente,  $p=0,0022$ ) quando comparado ao grupo **PRÉ** (tabela 3, gráfico 1).

Para o ensaio da assinatura de zinco o grupo **PÓS** apresentou menor porcentagem de espermatozoides com assinatura ZN 3 ( $1,95 \pm 0,61$  e  $4,86 \pm 1,02$ , respectivamente,  $p=0,0257$ ) e ZN 4 ( $38,62 \pm 3,91$  e  $55,55 \pm 4,55$ , respectivamente,  $p=0,0114$ ) comparado ao grupo **PRÉ** (tabela 3, gráfico 2).

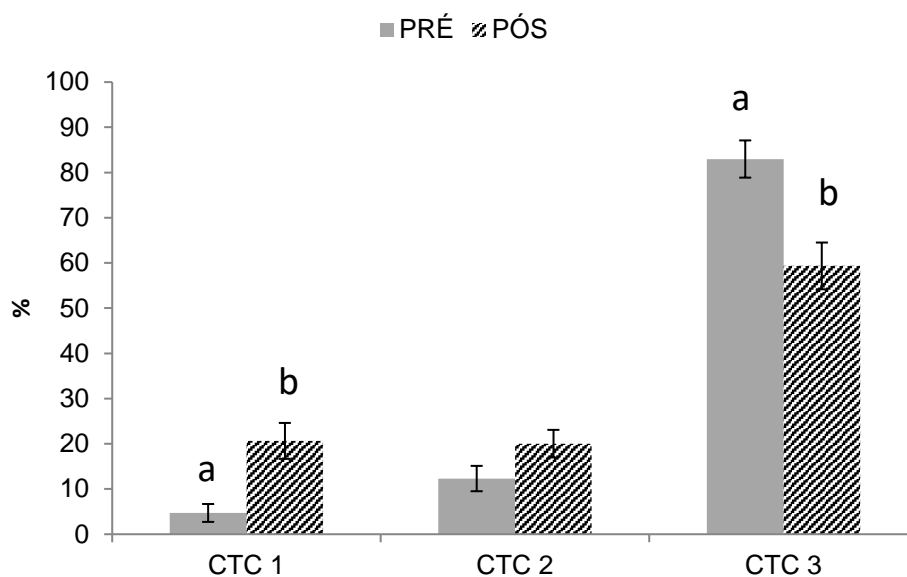
Tabela 3 - Média e erro padrão da média para as variáveis avaliadas para capacitação espermática pelo ensaio de CTC e assinatura de Zinco nos grupos PRÉ e PÓS, e valores de  $p$ .

Variáveis (%)	Grupo PRÉ	Grupo PÓS	$p$
CTC 1	$4,70 \pm 1,97^a$	$20,64 \pm 3,97^b$	0,0032
CTC 2	$12,31 \pm 2,80$	$20,02 \pm 3,05$	0,0792
CTC 3	$82,99 \pm 4,11^a$	$59,34 \pm 5,16^b$	0,0022
ZN 1	$6,20 \pm 2,31$	$14,11 \pm 4,21$	0,1180
]ZN 2	$33,39 \pm 4,32$	$45,32 \pm 3,96$	0,0569
ZN 3	$4,86 \pm 1,02^a$	$1,95 \pm 0,61^b$	0,0257
ZN 4	$55,55 \pm 4,55^a$	$38,62 \pm 3,91^b$	0,0114

Fonte: Simões (2021)

Legenda: CTC: ensaio de clortetraciclina; ZN: zinco. CTC 1: Não capacitado; CTC 2: capacitado; CTC 3: reagido. ZN 1: não capacitado; ZN 2: capacitado; ZN 3: em capacitação; ZN 4: membrana plasmática remodelada. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

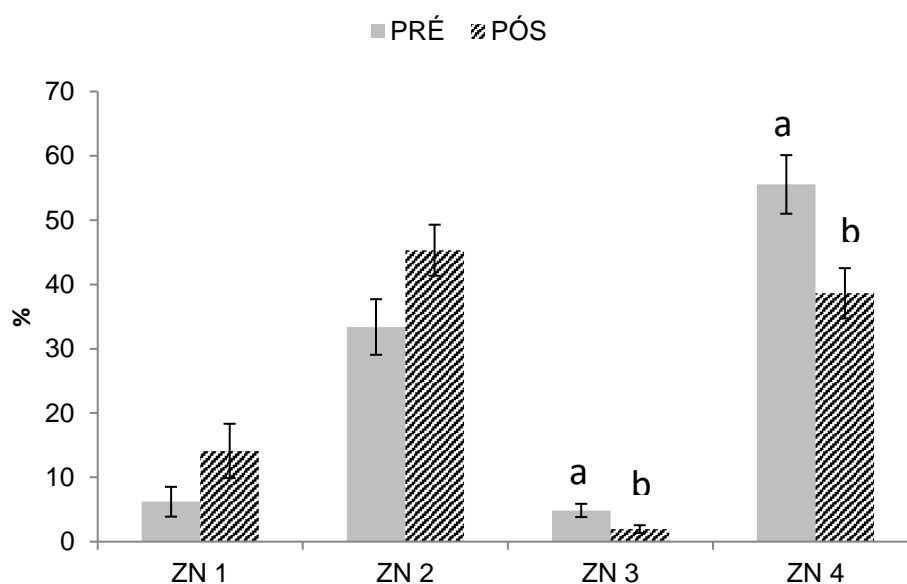
Gráfico 1: Porcentagem de espermatozoides com diferentes classificações de CTC nos grupos **PRÉ** e **PÓS** Percoll®.



Fonte: Simões (2021)

Legenda: CTC 1: Não capacitado; CTC 2: capacitado; CTC 3: reagido. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Gráfico 2: Porcentagem de espermatozoides com diferentes assinaturas de Zinco nos grupos **PRÉ** e **PÓS** Percoll®.



Fonte: Simões (2021)

Legenda: ZN 1: não capacitado; ZN 2: capacitado; ZN 3: em capacitação; ZN 4: membrana plasmática remodelada. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.4 OBTENÇÃO DOS DADOS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)

A tabela 4 apresenta a média da taxa de clivagem (número de estruturas clivadas/número de oócitos totais); da taxa de blastocisto (número de blastocistos/número de oócitos totais) e da taxa de desenvolvimento embrionário (número de estruturas blastocistos/número de estruturas clivadas) para cada um dos touros utilizados neste experimento.

Tabela 4 - Média e erro padrão da média das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário para cada touro Nelore utilizado neste experimento.

<b>Touro</b>	<b>Taxa de Clivagem (%)</b>	<b>Taxa de Blastocisto (%)</b>	<b>Taxa de Desenvolvimento Embrionário (%)</b>
1	76,88 ± 8,19	20 ± 7,35	23 ± 7,51
2	74,65 ± 6,05	10,81 ± 0,41	14,24 ± 1,73
3	72,71 ± 16,31	16,96 ± 7,46	24,63 ± 12,21
4	70,94 ± 8,07	14,21 ± 10,36	18,94 ± 13,02
5	76,75 ± 9,05	24,42 ± 3,96	31,91 ± 5,04
6	80,08 ± 3,80	14,36 ± 3,52	17,67 ± 3,61
7	82,52 ± 7,46	47,81 ± 9,03	55,39 ± 14,21
8	82,52 ± 6,99	29,69 ± 13,96	34,41 ± 15,46
9	68,14 ± 5,62	22,66 ± 2,30	33 ± 6,08
10	70,61 ± 19,94	16,16 ± 7,47	39,7 ± 5,34

Fonte: Simões (2021)

Legenda: Taxa de clivagem: número de estruturas clivadas/número de oócitos totais; Taxa de blastocisto: número de blastocisto/número de oócitos totais; Taxa de desenvolvimento embrionário: número de estruturas blastocisto/números de estruturas clivadas.

## 6.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

### 6.5.1 Status de capacitação espermática e taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos

Foi realizada análise de correlação entre as variáveis para a mensuração do status de capacitação espermática e as taxas de produção *in vitro* de embriões, portanto contemplando somente os dados obtidos no grupo **PÓS** (tabela 5).

Foram observadas correlações entre o CTC e a assinatura de ZN: correlação negativa alta (-0,67) entre assinatura ZN 1 (espermatozoide não capacitado) e a assinatura ZN 4 (espermatozoide com membrana plasmática remodelada). Além de correlações negativas altas entre CTC 1 (espermatozoide não capacitado) e CTC 3 (espermatozoide reagido; -0,82); e entre CTC 3 e CTC 2 (espermatozoide capacitado; -0,67).

Para as correlações observadas entre as variáveis de capacitação espermática e as taxas de produção *in vitro* foi verificada correlações negativas altas entre assinatura ZN 3 (espermatozoide capacitado) e a taxa de blastocisto (-0,63); e a taxa desenvolvimento embrionário *in vitro* (-0,65) (Gráfico 3).

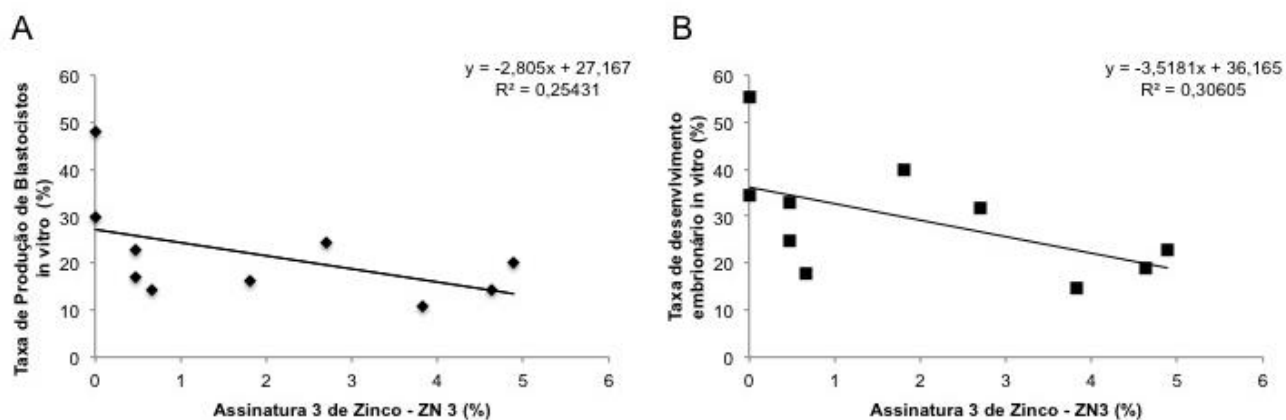
Tabela 5 - Tabela de correlação entre as variáveis status de capacitação espermática e as taxas de produção *in vitro* de embriões, coeficiente de correlação ( $\rho$ ) e probabilidade ( $p$ ).

	ZN 1	ZN 2	ZN 3	ZN 4	CTC 1	CTC 2	CTC 3	TC	TB	TDE
ZN 1	1	-0,28485 0,4250	0,49240 0,1482	-0,67273 <b>0,0330</b>	-0,72949 <b>0,0166</b>	0,00608 0,9867	0,57928 0,0793	-0,1155 0,7507	-0,24848 0,4888	-0,5272 0,1173
ZN 2		1	-0,14590 0,6876	-0,45455 0,1869	0,54104 0,1063	-0,32827 0,3544	-0,14025 0,6992	-0,1459 0,6876	0,13939 0,7009	0,09091 0,8028
ZN 3			1	-0,39514 0,2584	-0,25915 0,4697	0,31707 0,3720	-0,04587 0,8999	-0,29268 0,4118	-0,63222 <b>0,0498</b>	-0,6504 <b>0,0417</b>
ZN 4				1	0,26748 0,4550	0,22493 0,5321	-0,39025 0,2649	0,45593 0,1854	0,27273 0,4458	0,47879 0,1615
CTC 1					1	0,18598 0,6070	-0,82569 <b>0,0033</b>	0,17988 0,619	0,26748 0,455	0,36474 0,3001
CTC 2						1	-0,67279 <b>0,0330</b>	-0,01829 0,96	0,02432 0,9468	0,17021 0,6383
CTC 3							1	-0,10092 0,7815	-0,09147 0,8016	-0,2804 0,4325
TC								1	0,46201 0,1789	0,09119 0,8022
TB									1	0,78182 <b>0,0075</b>
TDE										1

Legenda: Valores de p vermelho = correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

CTC = clortetraciclina, ZN = Zinco, TC = taxa de clivagem, TB = taxa de blastocisto, TDE = Taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Gráfico 3: Gráficos de dispersão. A. Porcentagem de espermatozoides com a assinatura ZN 3 e taxa de produção de blastocistos *in vitro*. B. Porcentagem de espermatozoides com a assinatura ZN 3 e taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*.



Fonte: Simões (2021)

### 6.5.2 Status de capacitação e atributos espermáticos

No grupo **PRÉ** foram observadas correlações entre as variáveis do status de capacitação pela avaliação do Zinco e os atributos espermáticos (tabela 6): a assinatura ZN 1 (espermatozoide não capacitado) se correlacionou negativamente com a assinatura ZN 4 (espermatozoide com membrana plasmática remodelada; -0,65). A assinatura ZN 3 (espermatozoide capacitado) se correlacionou positivamente com a velocidade curvilínea (VCL; 0,64). Correlações entre o status de capacitação avaliado pela técnica do CTC e os atributos espermáticos também foram encontrados: a variável CTC 1 (espermatozoide não capacitado) se correlacionou negativamente com a variável CTC 3 (espermatozoide reagido; -0,65); enquanto que a variável CTC 2 (espermatozoide capacitado) correlacionou-se negativamente com a variável CTC 3 (espermatozoide reagido; -0,95), com os padrões de velocidade progressiva (PROGRESS; -0,85) e rápida (RAPID; -0,83); e positivamente com a porcentagem de espermatozoides estáticos (STATIC; 0,82) e porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (0,68). Já a variável CTC 3 (espermatozoide reagido) correlacionou-se positivamente com a porcentagem de espermatozoides móveis (MOTILE; 0,81), progressivos (PROGRESS; 0,89) e rápidos (RAPID; 0,91); e negativamente com estáticos (STATIC; -0,81).

No grupo **PÓS** Percoll® também foram observadas correlações entre as variáveis para avaliação do status de capacitação pela análise do Zinco e os atributos espermáticos (tabela 7): a assinatura ZN 1 (espermatozoide não capacitado) se correlacionou negativamente com a assinatura ZN 4 (espermatozoide com membrana plasmática remodelada; -0,67) e com os espermatozoides com motilidade curvilínea (VCL; -0,85); e positivamente com o batimento lateral da cabeça do espermatozoide (BCF; 0,66) e com a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e com estresse oxidativo (CellROX+/PI+; 0,75). A assinatura ZN 2 (espermatozoide em capacitação) se correlacionou negativamente com a porcentagem de espermatozoides com motilidade total (MOTILE; -0,84), motilidade progressiva (PROGRESS; -0,85), rápida (RAPID; -0,85), média (MEDIUM; -0,79), lenta (SLOW; -0,69) e, positivamente, com os espermatozoides estáticos (STATIC; 0,84). Já a assinatura ZN 3 (espermatozoide capacitado) se correlacionou positivamente com os atributos avaliados por citometria de fluxo: porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada (0,88), e membrana plasmática



lesada sem estresse oxidativo (CellROX-/PI+; 0,71); e negativamente com porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (-0,85), membrana plasmática lesada com estresse oxidativo (CellROX+/PI+; -0,75), membrana plasmática íntegra com estresse oxidativo (CellROX+/PI-; -0,66). Correlações entre o status de capacitação avaliado pela técnica da CTC e os atributos espermáticos também foram encontrados: a porcentagem de espermatozoides não capacitados (CTC 1) se correlacionou positivamente com a porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial (0,68) e com a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada com estresse oxidativo (CellROX+/PI+; 0,68); enquanto que negativamente com a porcentagem de espermatozoides reagidos (CTC 3; -0,82) e com a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada sem estresse oxidativo (CellROX-/PI+; -0,74). A porcentagem de espermatozoides capacitados (CTC 2) (correlacionou-se negativamente com a porcentagem de espermatozoides reagidos (CTC 3; -0,82) e positivamente com a porcentagem de espermatozoides com padrão de motilidade média (MEDIUM; 0,67) e com retilinearidade (STR; 0,69). Já a porcentagem de espermatozoides reagidos (CTC 3) correlacionou-se positivamente com a porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial intermediário (INTER; 0,70).

Tabela 6 - Tabela de correlação entre as variáveis status de capacitação e atributos espermáticos no grupo PRÉ.

	ZN1	ZN2	ZN3	ZN4	CTC1	CTC2	CTC3	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	MOTILE	PROGR	RAPID	MEDIUM	SLOW	STATIC	ALTO PMM	BAIXO PMM	PMM INTERM	MPL	MPI	CR+PI+	CR-PI+	CR+PI-	CR-PI-
<b>ZN1</b>	1	-0.27609	-0.02462	-0.65649	-0.20371	0.32518	-0.28837	0.09203	0.01841	0.01841	0.11657	-0.47243	-0.1548	-0.05539	-0.57409	-0.46156	-0.46106	-0.45502	-0.21806	0.57409	0.24616	-0.12884	-0.01841	-0.49697	0.49697	0.20342	-0.44074	0.5255	0.28818
		0.44	0.9462	<b>0.0392</b>	0.5724	0.3592	0.4191	0.8004	0.9597	0.9597	0.7484	0.168	0.6694	0.8792	0.0827	0.1793	0.1799	0.1864	0.545	0.0827	0.493	0.7228	0.9597	0.1439	0.1439	0.5996	0.2351	0.1462	0.4521
<b>ZN2</b>		1	-0.43769	-0.45455	0.38415	-0.29697	0.16364	-0.24848	-0.2	0.11515	0.27273	0.13939	-0.08563	-0.23708	0.55489	0.30395	0.27696	-0.0321	0.55117	-0.55489	-0.16413	-0.34545	0.26061	-0.15152	0.15152	-0.16667	0.1	-0.1	0.16667
			0.2058	0.1869	0.2731	0.4047	0.6515	0.4888	0.5796	0.7514	0.4458	0.7009	0.8141	0.5096	0.0959	0.3932	0.4385	0.9298	0.0987	0.0959	0.6505	0.3282	0.4671	0.6761	0.6761	0.6682	0.798	0.798	0.6682
<b>ZN3</b>			1	0.18237	0.17125	0.24924	-0.17629	0.53496	0.43769	0.64438	-0.231	0.34043	0.03374	0.12195	-0.31499	-0.26829	-0.16977	-0.25762	-0.17157	0.31499	0.33232	0.17629	-0.43769	0.34043	-0.34043	-0.08333	0.06667	-0.05	0.15
				0.6141	0.6362	0.4874	0.6261	0.1111	0.2058	<b>0.0443</b>	0.5208	0.3358	0.9263	0.7372	0.3754	0.4536	0.6392	0.4724	0.6355	0.3754	0.3482	0.6261	0.2058	0.3358	0.3358	0.8312	0.8647	0.8984	0.7001
<b>ZN4</b>				1	-0.18903	-0.07879	0.16364	-0.2	-0.16364	-0.34545	-0.15152	0.13939	0.04282	0.07903	0.15244	0.21277	0.28311	0.59073	-0.25975	-0.15244	-0.20061	0.47879	-0.12727	0.39394	-0.39394	0.1	0.25	-0.5	-0.38333
					0.601	0.8287	0.6515	0.5796	0.6515	0.3282	0.6761	0.7009	0.9065	0.8282	0.6742	0.5551	0.428	0.0721	0.4686	0.6742	0.5784	0.1615	0.7261	0.26	0.26	0.798	0.5165	0.1705	0.3085
<b>CTC1</b>					1	0.46342	-0.65855	0.04268	0.15244	0.46342	0.04878	0.20732	-0.07385	-0.02141	-0.25153	-0.44037	-0.48609	-0.25195	0.29321	0.25153	0.15902	-0.5244	0.39025	0.29879	-0.29879	-0.75314	0.3431	-0.41005	0.30126
						0.1774	<b>0.0384</b>	0.9068	0.6742	0.1774	0.8935	0.5655	0.8393	0.9532	0.4833	0.2028	0.1543	0.4825	0.411	0.4833	0.6608	0.1197	0.2649	0.4017	0.4017	0.0191	0.366	0.273	0.4308
<b>CTC2</b>						1	-0.95152	-0.18788	-0.15152	0.12727	0.21212	-0.12727	-0.39757	-0.231	-0.82319	-0.85715	-0.83702	0.1541	-0.29143	0.82319	0.68085	-0.21212	-0.0303	-0.0303	0.0303	-0.63333	0.16667	-0.1	0
							<b>&lt;.0001</b>	0.6032	0.6761	0.7261	0.5563	0.7261	0.2552	0.5208	0.0034	<b>0.0015</b>	<b>0.0025</b>	0.6708	0.4139	<b>0.0034</b>	<b>0.0302</b>	0.5563	0.9338	0.9338	0.9338	0.0671	0.6682	0.798	1
<b>CTC3</b>							1	0.16364	0.10303	-0.23636	-0.24848	0.16364	0.39145	0.23708	0.81099	0.8997	0.91088	0.01926	0.09503	-0.81099	-0.51672	0.32121	-0.16364	-0.01818	0.01818	0.73333	-0.25	0.15	-0.06667
								0.6515	0.777	0.5109	0.4888	0.6515	0.2633	0.5096	<b>0.0044</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0002</b>	0.9579	0.794	<b>0.0044</b>	0.1262	0.3655	0.6515	0.9602	0.9602	<b>0.0246</b>	0.5165	0.7001	0.8647
<b>VAP</b>								1	0.97576	0.49091	-0.61212	0.3697	0.71563	0.70517	-0.09147	0.15806	0.04924	-0.65494	-0.13304	0.09147	0.16413	-0.33333	-0.00606	0.41818	-0.41818	-0.1	-0.03333	0	0.38333
									<b>&lt;.0001</b>	0.1497	<b>0.06</b>	0.2931	<b>0.02</b>	<b>0.0227</b>	0.8016	0.6628	0.8926	<b>0.0399</b>	0.7141	0.8016	0.6505	0.3466	0.9867	0.2291	0.2291	0.798	0.9322	1	0.3085
<b>VSL</b>									1	0.39394	-0.67273	0.39394	0.80737	0.80244	-0.08537	0.18237	0.04308	-0.61641	-0.17105	0.08537	0.17021	-0.46667	0.13939	0.49091	-0.49091	-0.25	0.03333	-0.18333	0.43333
										0.26	<b>0.033</b>	0.26	<b>0.0047</b>	<b>0.0052</b>	0.8146	0.6141	0.9059	0.0577	0.6366	0.8146	0.6383	0.1739	0.7009	0.1497	0.1497	0.5165	0.9322	0.6368	0.244
<b>VCL</b>										1	0.10303	0.24848	-0.17126	-0.18237	-0.20122	-0.38298	-0.36927	-0.57789	0.50049	0.20122	0.09119	-0.0303	-0.21212	0.13939	-0.13939	-0.21667	0.11667	0.3	0.15
											0.777	0.4888	0.6362	0.6141	0.5772	0.2747	0.2936	0.0802	0.1407	0.5772	0.8022	0.9338	0.5563	0.7009	0.7009	0.5755	0.765	0.4328	0.7001
<b>ALH</b>											1	-0.69697	-0.80737	-0.8693	-0.21952	-0.42553	-0.32619	0.14768	0.36111	0.21952	-0.08511	0.15152	0.17576	-0.41818	0.41818	-0.1	0.16667	0.41667	-0.38333
												<b>0.0251</b>	<b>0.0047</b>	<b>0.0011</b>	0.5423	0.2202	0.3577	0.6839	0.3053	0.5423	0.8152	0.6761	0.6272	0.2291	0.798	0.6682	0.2646	0.3085	
<b>BCF</b>												1	0.39757	0.41338	0.45123	0.35866	0.32619	0.08989	0.09503	-0.45123	0.1459	0.05455	-0.50303	0.28485	-0.28485	-0.01667	-0.11667	-0.23333	0.3
													0.2552	0.2351	0.1905	0.3088	0.3577	0.8049	0.794	0.1905	0.6876	0.881	0.1383	0.425	0.425	0.9661	0.765	0.5457	0.4328
<b>STR</b>													1	0.96628	0.25846	0.59817	0.44721	-0.28189	-0.36444	-0.25846	0.02454	-0.47097	0.26912	0.45873	-0.45873	-0.11765	-0.0084	-0.48741	0.38657
														<b>&lt;.0001</b>	0.4709	0.0677	0.195	0.4301	0.3005	0.4709	0.9464	0.1695	0.4521	0.1824	0.1824	0.7631	0.9829	0.1832	0.3041
<b>LIN</b>														1	0.11315	0.45732	0.32101	-0.29948	-0.43529	-0.11315	0.07317	-0.42553	0.21885	0.4073	-0.4073	-0.14226	-0.09205	-0.51883	0.48536
															0.7556	0.1839	0.3658	0.4005	0.2086	0.7556	0.8408	0.2202	0.5436	0.2427	0.2427	0.715	0.8138	0.1524	0.1854
<b>MOTILE</b>															1	0.88074	0.88858	0.19704	0.36651	-1	-0.52294	0.24391	-0.15244	-0.05488	0.05488	0.5021	-0.20921	-0.05858	0.06695
<b>E</b>																<b>0.0008</b>	<b>0.0006</b>	0.5853	0.2976	<b>&lt;.0001</b>	0.1209	0.4971	0.6742	0.8803	0.8803	0.1684	0.589	0.881	0.8641
<b>PROGR</b>																1	0.96921	0.13847	-0.01271	-0.88074	-0.38415	0.06687	-0.01216	0.09726	-0.09726	0.44352	-0.20084	-0.20921	0.12552
																	<b>&lt;.0001</b>	0.7028	0.9722	<b>0.0008</b>	0.2731	0.8544	0.9734	0.7892	0.7892	0.2318	0.6044	0.589	0.7476
<b>RAPID</b>																	1	0.2054	-0.01287	-0.88858	-0.39818	0.22772	-0.12925	0.01846	-0.01846	0.54245	-0.23732	-0.20342	0.11866
																		0.5692	0.9719	<b>0.0006</b>	0.2544	0.5269	0.7219	0.9596	0.9596	0.1313	0.5387	0.5996	0.7611
<b>MEDIU</b>																		1	-0.3054	-0.19704	0.22542	0.31463	-0.28252	0.05137	-0.05137	-0.03563	0.24054	-0.23163	-0.52324
<b>M</b>																			0.3908	0.5853	0.5312	0.3759	0.429	0.8879	0.8879	0.9275	0.533	0.5487	0.123
<b>SLOW</b>																			1	-0.36651	-0.60051	0.24074	-0.01267	-0.34844	0.34844	0.19506	-0.2394	0.46993	0.1862
<b>STATIC</b>																				0.2976	0.0664	0.5029	0.9723	0.3238	0.3238	0.615	0.535	0.2018	0.6315
<b>ALTO PMM</b>																				1	0.52294	-0.24391	0.15244	0.05488	-0.05488	-0.5021	0.20921	0.05858	-0.06695
<b>BAIXO PMM</b>																					0.1209	0.4971	0.6742	0.8803	0.8803	0.1684	0.589	0.881	0.8641
<b>PMM INTERM</b>																													



## 7 DISCUSSÃO

Os pesquisadores vêm buscando um método que seja simples e capaz de identificar a fertilidade dos espermatozoides em bovinos. Diversos fatores podem interferir na avaliação da célula espermática, uma vez que essa possui um conjunto de atributos que determinam a sua capacidade fecundante (GRAHAM; MOCÉ, 2005; GILLAN et al., 2008). A avaliação conjunta de vários parâmetros espermáticos é capaz de identificar mais precisamente a fertilidade do touro (OLIVEIRA et al., 2012). *In vitro*, considerar a avaliação da biologia do espermatozoide por meio da sua funcionalidade pode colaborar na interpretação da capacidade fecundante.

A seleção e a capacitação espermática são processos fundamentais para uma fecundação eficiente, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Neste último, o processo é mimetizado pela submissão dos espermatozoides ao gradiente de densidade Percoll® e à ação de agentes capacitantes adicionados ao meio de PIVE. Portanto, avaliar o status de capacitação espermática no momento da utilização dos espermatozoides na PIVE pode ser uma ferramenta importante para melhorar a eficiência do processo. No entanto, além de mimetizar molecular e fisicamente, há a necessidade de uma sincronia temporal. Uma capacitação espermática prematura pode afetar negativamente a produção *in vitro* de embriões, já que oócito pode não estar ainda pronto para a fecundação. Dessa maneira, o presente estudo buscou avaliar a motilidade, a funcionalidade e os graus de capacitação espermática em amostras seminais bovinas submetidas (**PÓS**) ou não (**PRÉ**) ao gradiente de densidade Percoll®. E ainda, correlacionar, no grupo **PÓS**, as taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos com as categorias indicadoras de capacitação espermática avaliadas pelo ensaio da CTC e pelas assinaturas de zinco.

Foi observado maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e com marcação positiva para estresse oxidativo, maior porcentagem de espermatozoides não capacitados e reagidos no grupo **PÓS** quando avaliado pela técnica de avaliação do status de capacitação pelo ensaio da CTC. Quando foi utilizado a técnica de avaliação do status de capacitação pelas assinaturas de Zinco o grupo **PÓS** apresentou porcentagens menores de espermatozoides em capacitação e capacitados. Esse resultado condiz com o efeito de correlação negativa entre as porcentagens de espermatozoides não capacitados e capacitados no grupo **PÓS** e confirma a hipótese do presente estudo. Ademais, surpreendentemente, foi observado,

também, correlações negativas altas entre a porcentagem de espermatozoides capacitados e as taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

A avaliação mais utilizada para indicar a qualidade seminal é a motilidade espermática, que mensura a quantidade de espermatozoides móveis existentes no ejaculado (KATHIRAVAN et al., 2011). Essa característica é avaliada de modo subjetivo por suposição visual, que analisa o movimento espermático em microscopia óptica (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, 2002; KATHIRAVAN et al., 2011). Estima-se que a probabilidade de haver variação entre avaliadores é de 30 a 60%. Um método que reduz essa subjetividade é a avaliação computadorizada (CASA) que permite avaliar vários parâmetros da movimentação espermática (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, 2002). O sistema CASA identifica os espermatozoides no campo microscópico e avalia uma sequência de movimentos, apresentando um perfil de cinética dos espermatozoides (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, 2002).

Segundo Matos et al. (2009) processamentos no sêmen como congelação/descongelação, lavagem e diluição podem levar a uma variabilidade nos resultados de parâmetros espermáticos analisados pelo CASA. O presente estudo apresentou diferenças significativas no parâmetro de retilinearidade (STR) entre os grupos **PRÉ** e **PÓS** Percoll®, sendo a maior porcentagem no grupo **PRÉ** Percoll®. Esse resultado difere do relatado por Mack et al. (1988), que não verificaram diferença em relação a esse parâmetro ao estudarem sêmen humano submetido à lavagem. Estudos que tentaram correlacionar os parâmetros do CASA com a fertilidade verificaram maiores VAP, VSL e VCL em amostras de sêmen com mais de 50% de taxa de fecundação e correlacionaram positivamente os parâmetros BCF e LIN com taxa de prenhez (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, 2002). Em outro estudo realizado com varrões, os autores identificaram o parâmetro motilidade total como um indicador de fertilidade (HIRAI et al., 2001), no entanto no presente trabalho foi observado uma correlação negativa, no grupo **PRÉ**, entre a porcentagem de espermatozoides capacitados e a porcentagem de espermatozoides móveis, progressivos e rápidos, indicando diminuição da hiperativação da motilidade espermática conforme aumentou o status de capacitação.

A movimentação do espermatozoide se dá por meio da produção de energia pela mitocôndria (FORD, 2006; DU PLESSIS et al., 2015). A mitocôndria é responsável por produzir ATP e gerar energia para o espermatozoide (GRAVANCE et

al., 2000), além de produzir ROS intracelular (AITKEN et al., 2012b). O processo de capacitação espermática envolve a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AITKEN, 1995) que promovem a retirada do colesterol da membrana plasmática e aumentam a permeabilidade e o influxo de cálcio (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017). Sendo assim, as ROS desempenham papel importante na capacitação espermática, no entanto em altos níveis é prejudicial para a função espermática (MORTIMER, 2000). Em níveis elevados, as ROS prejudicam vários atributos espermáticos como danos no DNA, morfologia, potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana acrossomal (HAMILTON et al., 2016), além de prejudicar o desenvolvimento embrionário (KATO; NAGAO, 2015). As clínicas de reprodução assistida realizam, rotineiramente, a identificação das ROS no sêmen, já que é considerada uma das principais causas de infertilidade no homem (LEWIS et al., 1997).

O presente estudo apresentou uma maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e com estresse oxidativo no grupo **PÓS** Percoll®, além de correlação positiva entre espermatozoides não capacitados e espermatozoides com membrana lesada e com estresse oxidativo, indicando que o gradiente de densidade Percoll® pode selecionar espermatozoides com estresse oxidativo, mas ainda não capacitados. Segundo Aitken e Clarkson (1988), amostras submetidas à subsequentes centrifugações produzem mais espécies reativas de oxigênio. Já um estudo realizado em suínos, no qual amostras foram submetidas ao gradiente 90 e 45%, resultaram em menores taxas de produção de ROS (MATÁS et al., 2011). Estudos correlacionam espermatozoides mortos (SARIÖZKAN et al., 2010) e espermatozoides imaturos com a alta produção de ROS (GARRIDO et al., 2004), corroborando com o resultado do presente estudo, em que as amostras do grupo **PÓS** Percoll® apresentaram mais espermatozoides não capacitados e com estresse oxidativo positivo. Segundo Bilodeau et al. (2002) os espermatozoides possuem mecanismos como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para prevenir as injúrias causadas pelas ROS, porém durante a seleção espermática ocorre a remoção dessas principais defesas. Tais afirmações podem, portanto, sugerir que espermatozoides submetidos ao gradiente de densidade Percoll® podem ser mais susceptíveis à ação das ROS, que agem na membrana plasmática causando peroxidação lipídica (LOSANO et al., 2018).

Alterações na integridade da membrana espermática podem ocasionar diminuição da motilidade e aumento da permeabilidade da membrana, tendo uma consequência negativa no processo de fecundação (ARMSTRONG et al., 1999), sendo que essas podem estar relacionada com a força de centrifugação e com o volume do Percoll® utilizado (MACHADO et al, 2009). No entanto, neste estudo foi observado uma maior porcentagem de espermatozoides com a membrana íntegra **PÓS** Percoll®, discordante de Folchini et al. (2012), que demonstraram maior porcentagem de espermatozoides com a membrana lesada em amostras submetidas ao gradiente de densidade com volume de 90% e 45 % e uma força de centrifugação de 9000g durante cinco minutos, enquanto que no presente estudo o volume foi o mesmo e a força de centrifugação foi de 6600g por cinco minutos.

A técnica de seleção dos espermatozoides deve ser apta a recuperar grande quantidade de espermatozoides, excluir substâncias que podem ser prejudiciais, como as ROS, sem causar danificações estruturais (HENKEL; SCHILL, 2003). A utilização do gradiente Percoll® é essencial para selecionar espermatozoides viáveis para a fecundação *in vitro* (SAMARDZIJA et al., 2006), sendo este o mais utilizado devido a eficácia na recuperação das células (BORGES et al., 2007). Vários estudos foram realizados testando a força e o tempo de centrifugação no intuito de melhorar a recuperação espermática. Uma maior força de centrifugação associada com um menor tempo aumenta a taxa de recuperação (WAITE et al., 2008), no entanto Missio et al., (2018) relatam que um tempo mais longo de centrifugação pode aumentar a recuperação dos espermatozoides. Apesar da grande utilização, existem diversos protocolos, gradientes distintos, força de centrifugação e tempos diferentes. Não está claro, ainda, se a passagem dos espermatozoides no gradiente de Percoll® promove a capacitação completa dos espermatozoides (MENDES et al., 2003), justificando o presente estudo.

Os resultados deste estudo demonstram que o gradiente de densidade Percoll® separa os espermatozoides capacitados dos não capacitados, demonstrado pela menor porcentagem de espermatozoides capacitados no grupo **PÓS** Percoll® (assinatura 3 e 4 de zinco e categoria CTC 1), o que confirma a hipótese formulada. Esses resultados contrariam o apresentado por Mendes et al. (2003) o qual sugere que não há necessidade de se utilizar agentes capacitantes no meio de fecundação *in vitro* em amostras seminais submetidas ao gradiente de Percoll®. Segundo Oshio. (1988) o sedimento formado após o gradiente Percoll® apresenta espermatozoides

maduros, pois segundo Sakkas et al., 2015 estes possuem uma densidade maior do que os imaturos. Um estudo realizado em espermatozoides humanos, utilizando diferentes gradientes de densidade demonstrou que a camada intermediária é capaz de reter uma grande quantidade de espermatozoides imaturos (OLLERO et al., 2001).

Um fato importante a ser considerado é que as amostras utilizadas neste experimento eram criopreservadas. Sabe-se que a criopreservação induz alterações na região lipídica da membrana do espermatozoide, promovendo o aumento da permeabilidade celular e conseqüentemente entrada de cálcio na célula, podendo ou não induzir a capacitação espermática (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). Com isso, os resultados deste trabalho sugerem um benefício do uso do gradiente de densidade, ao remover os espermatozoides capacitados pelo processo de criopreservação.

Observamos uma correlação negativa entre espermatozoides capacitados (ZN3) com a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Segundo Rodriguez-martinez. (2001) mesmo com a utilização de agentes capacitores no meio FIV, é necessário que os espermatozoides fiquem um período mais longo neste ambiente, por não responderem ao processo de capacitação sincronicamente. Sendo assim a capacitação espermática antecipada resulta na reação acrossomal precoce e conseqüentemente perda da viabilidade espermática no momento da fecundação dos oócitos (KURODA; FUKUSHIMA; HARAYAMA, 2007; AITKEN, 2017) e, portanto, prejudicial a PIVE. Outros estudos indicam que a capacitação precoce na fecundação *in vitro* pode não ser tão prejudicial, já que os espermatozoides são incubados junto com os oócitos excluindo a necessidade de uma viabilidade por um período mais longo (HARRISON, 1996; SEIDEL, 2015). A rápida fecundação potencializa o desenvolvimento embrionário levando a um sucesso na PIVE (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990; MILAZZOTTO et al., 2020). Neste trabalho o Percoll® selecionou espermatozoides não capacitados, o que sustenta o princípio de que espermatozoides já capacitados não são capazes de fecundar o oócito. Essa separação permite que os oócitos sejam inseminados com uma população de espermatozoides mais homogênea, que irão de forma sincrônica, sofrer o processo de capacitação, melhorando a eficiência da PIVE. Segundo Jaiswal e Eisenbachl (2002) o processo de capacitação espermática é essencial para a fecundação, porém é um evento final que leva à morte celular caso ele não tenha fecundado o oócito.



Kerns et al. (2018) identificaram maior porcentagem de espermatozoides com assinatura 3 de zinco (capacitados) em amostras seminais de cachacos com alta fertilidade. Já em outro estudo, os autores relatam aumento nos biomarcadores induzidos pela capacitação em espermatozoides com alta capacidade fecundante (BUFFONE et al., 2005).

A capacidade do espermatozoide em sofrer a capacitação espermática varia de animal para animal, podendo ou não justificar as diferenças nos resultados de PIVE entre touros (THUNDATHIL et al., 1999; ZHANG; LU; SEIDEL, 2003).

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram confirmar a hipótese formulada. Ou seja, a separação dos espermatozoides criopreservados, por meio do gradiente de densidade Percoll® separa as células capacitadas das não capacitadas. Esse processo parece ser importante na PIVE uma vez que houve correlação positiva entre a maior porcentagem de células não capacitadas e as taxas de desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 485, n. 1, p. 72–81, 2009.
- ABIEC. Beef Report: Perfil da pecuária no Brasil. BeefREPORT, p. 49, 2020. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/controle/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>.
- AITKEN, R. J. et al. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 1–11, 2012a.
- AITKEN, R. J. et al. The simmet lecture: New horizons on an old landscape - oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 7–14, 2012b.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 10, p. 1039–1052, 2017.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 66–69, 2006.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 6, p. 367–376, 1988.
- ALLOUCHE-FITOUSSI, D.; BREITBART, H. The role of zinc in male fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–15, 2020.
- ALOMAR, M. et al. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1–2, p. 48–61, 2008.
- AMANN, R.; SEIDEL, G.; MORTIMER, R. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. **Theriogenology**, v. 54, n. 9, p. 1499–1515, 2000.
- AMARAL, A. et al. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, n. 5, 2013.
- ANDREWS, J. C.; BAVISTER, B. D. Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein-free culture medium. **Gamete Research**, v. 23, n. 2, p. 159–170, 1989.
- ANDREYCHENKO, S. V. et al. Post-chornobyl remote radiation effects on human

sperm and seminal Plasma characteristics. **Experimental Oncology**, v. 38, n. 4, p. 245–251, 2016.

AONUMA, S.; OKABE, M.; SCIENCES, P. in vitro Kawaguchi. p. 4–5, [s.d.]

ARMSTRONG, J. S. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 7–8, p. 869–880, 1999.

ARRUDA, R. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47–60, 2015.

EVERY, G. Used for. **Theriogenology**, v. 44, n. 95, p. 871–878, 1995.

BARTH, A. D.; OKO, R. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 1, p. 22, 1992.

BARUSELLI, P. S. et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 43, p. 308–314, 2019.

BERLINGUER, F. et al. Semen molecular and cellular features: These parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 125, 2009.

BERNARDI, M. L. Produção in vitro de embriões ovinos. v. 33, n. July 2004, p. 1–16, 2005.

BILODEAU, J.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **THERIOGENOLOGY**, v. 57, p. 1105-1122, 2002.

BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: Relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 619–628, 1990.

BOERSMA, A.; RASSHOFER, R.; STOLLA, R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 5, p. 222–229, 2001.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; VANTINI R.; RESENDE, M. V.; LUCIO, A. C.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Comparação dos métodos de seleção de

espermatozoides (Percoll x Lavagem) nos índices de produção in vitro de embriões bovinos. **Acta Sci Vet**, v.35, supl.3, p.1178, 2007.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N. Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, n. 1–2, p. 247–249, 2006.

BRITO, L. F. C. Variations in Laboratory Semen Evaluation Procedures and Testing. **Proceedings of the 23 technical conference on artificial insemination & reproduction**, n. July, p. 1–7, 2010.

BUFFONE, M. G. et al. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 697–705, 2005.

CESARI, A. et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1185–1193, 2006.

CHANG, M. C.; PINCUS, G. Physiology of Fertilization in Mammals. **Physiological reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–26, jan. 1951.

CHU, D. S. Zinc: A small molecule with a big impact on sperm function. **PLoS Biology**, v. 16, n. 6, p. 7–11, 2018.

CHVAPIL, M. New aspects in the biological role of zinc: A stabilizer of macromolecules and biological membranes. **Life Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1041–1049, 1973.

COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T.; CHAICHI, M. J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. **Nutrition Research**, v. 29, n. 2, p. 82–88, 2009.

DAYAN, A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Botucatu. UNESP. 2001.

DE CASTRO, L. S. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DIETRICH, N.; SCHNEIDER, D. L.; KORNFELD, K. A pathway for low zinc homeostasis that is conserved in animals and acts in parallel to the pathway for high zinc homeostasis. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 20, p. 11658–11672, 2017.

DODE, M.A.N; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun, 2013.

DU PLESSIS, S. S. et al. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. **Journal of Assisted Reproduction and**

**Genetics**, v. 32, n. 4, p. 509–520, 2015.

FABER, D. C. et al. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 125–138, 2003.

FLÉCHON, J. E. The acrosome of eutherian mammals. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 147–157, 2016.

FOLCHINI, N. P.; LEIVAS, F.G.; SANTOS, F.W.; SCHWENGBER, E. B.; MARTIN, D. M.; SPIAZZI, C. C.; BRUM, D. S. Uso do mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, p.239-244,2012.

Food and Agriculture Organization (FAO). Cenário da demanda por alimentos no Brasil, 2017. Rome: FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>

FORD, W. C. L. Glycolysis and sperm motility: Does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 269–274, 2006.

FRENEAU, G. E. et al. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 176–181, 2010.

GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3–4, p. 249–265, 2001.

GADELLA, B.; RATHI, R.; BROUWERS, J.; STOUT, T.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3, p. 249-265, 2001.

GARRIDO, N., MESEGUER, M., SIMON, C. Peroxidative and antioxidative imbalance in human sêmen and its relation with male infertility. **Asian J. Androl.** 6: 59-65, 2004.

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127–138, 1986.

GARNER, D. L. et al. Garner, Johnson - 1995 - Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. v. 1406, p. 1–9, 1997.

GEORGADAKI, K. et al. The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 979–986, 2016.

GILLAN, L. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3–4, p. 201–214, 2008.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 445–457, 2005.

GOODHAND, K. L.; WATT, R.G.; STAINERS, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.;

BROADBENT.; P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.951-961, 1999

GOISSIS, M. D.; CIBELLI, J. B. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 2, p. 1–10, 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, R. F.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in Vitro De Embriões Bovinos: Estado Da Arte. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. Especial 2, p. 402–415, 2007.

GONÇALVES PBD, FIGUEIREDO JR, FREITAS VJF. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 1.ed. São Paulo, Brasil: Varela, 340p, 2002

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 55–64, 1990.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492–504, 2005.

GRAVANCE, C. G. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691–1703, 2000.

HALLAP, T. et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, n. 3–4, p. 702–713, 2004.

HALLAP, T. et al. 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. 1122–1136, 2006.

HAMILTON, T. R. D. S. et al. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

HARRISON, R. A. P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 581–594, 1996.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343–352, 1990.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. December, 2003.

HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of**

**Andrology**, v. 22, n. 1, p. 104–110, 2001.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 11, p. 934–943, 2010.

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 527–535, 2004.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 675–685, 2003.

HUACUJA. Printed in Great Britain ( Received February 1973 ; in final form 16 March 1973 ) Effect of Asbestos on Collagen Production. v. 12, n. 4, p. 441–451, 1973.

IBGE. PIB cai 4,1% em 2020 e fecha ano em R\$ 7,4 trilhões.

JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S. K. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1–2, p. 40–47, 2011.

JAISWAL, B.S.; EISENBACH, M. Capacitation. In Hardy DM (ed.) Fertilization. **Academic Press**, San Diego, pp. 57–117, 2002.

JOHN AITKEN, R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659–668, 1995.

KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. G. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 136–144, 2017.

KATHIRAVAN, P. et al. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165–172, 2011.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Changes in sperm motility and capacitation induce chromosomal aberration of the bovine embryo following intracytoplasmic sperm injection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015.

KERNS, K. et al. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

KERNS, K. et al. Sperm cohort-specific zinc signature acquisition and capacitation-induced zinc flux regulate sperm-oviduct and sperm-zona pellucida interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1–16, 2020.

KERNS, K.; ZIGO, M.; SUTOVSKY, P. Zinc: A necessary ion for mammalian sperm fertilization competency. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.



KURODA, K.; FUKUSHIMA, M.; HARAYAMA, H. Premature capacitation of frozen-thawed spermatozoa from subfertile Japanese Black cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 5, p. 1079–1086, 2007.

LAMY, J. et al. **Page 1 of 32** 1. 2015. Cambridge, England, 2015.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23–42, 2008.

LEE, H. L. et al. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249–255, 2009.

LEEMANS, B. et al. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 1, 2014.

LESSLEY, B. A.; GARNER, D. L. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. **Gamete Research**, v. 7, n. 1, p. 49–61, 1983.

LEWIS, S. E. M. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 1, p. 142–147, 1997.

LISHKO, P. V. et al. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 327–337, 2010.

LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1999.

LOSANO, J. Di. D. A. et al. Spermatic mitochondria: Role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. **Zygote**, v. 26, n. 4, p. 251–260, 2018.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289–1297, 2009.

MACÍAS-GARCÍA, B. et al. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. **Reproduction**, v. 149, n. 1, p. 87–99, 2015.

MACK, S. O.; WOLF, D. P.; TASH, J. S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 270–281, 1988.

MANN, T. "The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract," 2nd ed. London: Methuen, pp 53-58, 1964.

MATÁS, C. et al. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1–2, p. 62–72, 2011.

MATOS, D. L. et al. Análise computarizada de espermatozoides : revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 32, n. 4, p. 225–232, 2009.

MENDES, J. O. B. et al. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 331–340, 2003.

MILAZZOTTO, M. P. et al. Erasing gametes to write blastocysts: Metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 1–23, 2020.

MISSIO, D. et al. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 146–153, 2018.

MORTIMER, S. T. Andrology Lab Corner CASA—**Practical Aspects**. v. 21, n. 3, 2000.

NARASIMHAIAH, M. et al. Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 644–654, 2018.

NAZ, R. K. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: Novel perspectives. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 51, n. 5, p. 390–397, 2004.

O' MEARA, C. M. et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 513–522, 2008.

OKABE, M. Sperm-egg interaction and fertilization : past , present , and future The dawn of fertilization research. **Biology of Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 134–146, 2018.

OLIVEIRA, L. Z. et al. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 9–15, 2012.

OLLERO, M. et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1912–1921, 2001.

OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. **Gamete Research**, v. 20, n. 2, p. 159–164, 1988.

OSTERMEIER., D. M.; HUNTRISS, JOHN D., M. P. D.; KRAWETZ, S. A. Tuning holes in photonic-crystal nanocavities. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 1–1, 2004.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257–262, 2004.

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. . MU&Z 3, 199s. **Development**, n. 95, 1995.

PEÑA, F. J. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. **Animal Reproduction**, v. 12, n.3, p. 351-355, 2015.

PEÑA, F. J. et al. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: A new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 677–689, 2003.

PEREZ SIQUEIRA, A. F. et al. Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–16, 2018.

PERTOFT, H. et al. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). **Analytical Biochemistry**, v. 88, n. 1, p. 271–282, 1978.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 44, n. 1–2, p. 1–30, 2000.

PIOMBONI, P. et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 2, p. 109–124, 2012.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 4, p. 525–537, 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.

PRAKASH, P. et al. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim- up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 4, p. 722–726, 1998.

PRASAD, A. S. et al. Zinc status and serum testosterone levels of healthy adults. **Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 344–348, 1996.

QUE, E. L. et al. Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. **Nature Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 130–139, 2015.

QUE, E. L. et al. Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 9, n. 2, p. 135–144, 2017.

RENESTO, A. ASSOCIAÇÃO DAS BIOTÉCNICAS: ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRAFIA E SUPEROVULAÇÃO NA PRODUÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE EMBRIÕES BOVINOS. Dissertação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. Jaboticabal. 2004

RIFFO, M.; LEIVA, S.; ASTUDILLO, J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v. 15, n. 3, p. 229–237, 1992.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. **ARCHIV FUR TIERZUCHT**, v. 44, n., p. 102-113, 2001.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 2–10, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; VEGA, F. P. Semen technologies in domestic animal species. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 26–33, 2013.

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H., 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod. Fertil. Dev.** 9, 297–308.

RUIZ, M.E., RIVERA, B., RUIZ, A., Reproducción Animal: métodos de estudios en sistemas. San José – CR. 342 pág. ISSN 0253-4746. 1998.

SAKKAS, D. et al. Sperm selection in natural conception: What can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 711–726, 2015.

SAMARDZIJA, M. et al. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1–7, 2006.

SANGILD, P. T. et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1495–1504, 2000.

SARIÖZKAN, S. et al. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 3, p. 316–323, 2010.

SARTORI, R. et al. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.

SEIDEL, G. E. Lessons from reproductive technology research. **Annual Review of**

**Animal Biosciences**, v. 3, p. 467–487, 2015.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI, S. M. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. **Small Ruminant Research**, v. 58, n. 3, p. 283–286, 2005.

SOLLINGER, D. et al. Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 101, n. 3, p. 464–472, 2014.

SOMFAI, T. et al. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 5, p. 285–290, 2002.

SOUSA, A. P. et al. Not all sperm are equal: Functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

STEPHENSON, J. L.; BRACKETT, B. G. Influences of zinc on fertilisation and development of bovine oocytes in vitro. **Zygote**, v. 7, n. 3, p. 195–201, 1999.

SUZUKI, K. et al. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Animal Reproduction Science**, v. 77, n. 3–4, p. 157–172, 2003.

TANEJA, M. et al. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: Influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206–213, 2000.

TARDIF, S.; DUBÉ, C.; BAILEY, J. L. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 207–213, 2003.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - A decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 263–275, 2000.

THUNDATHIL, J. et al. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 366–373, 1999.

TULSIANI, D. R. P.; ZENG, H. T.; ABOU-HAILA, A. Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 63, n. February 2007, p. 257–272, 2007.

Underwood, E.; Somers, M. Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. **Aust. J. Agric. Res.** 1969, 20, 889–897.

UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 37–44, 2016.

VARAGO, F. C.; MENDOÇA, L.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 100–109, 2008.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, and O. K. COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYZERS IN ANDROLOGY RESEARCH AND VETERINARY PRACTICE. n. February 1921, p. 1–4, 2002.

VIANA, J.K.; SIQUEIRA, L. G. B., PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.38, n. 2, p. 661-674, 2010.

VINCENT, P. et al. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. **Bovine Reproduction**, p. 685–695, 2014.

WAITE. Addition of serine protease inhibitors during equine semen cooling and freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 354–355, 2008.

WANI, N. A. et al. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36, n. 1, p. 63–67, 2000.

WANI NA, WANI GM, KHAN MZ, SALAHUDIN S. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. **Small Rumin Res**, v.36, p.63-67, 2000

WARD, C. R.; STOREY, B. T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. **Developmental Biology**, v. 104, n. 2, p. 287–296, 1984.

WARD, F. et al. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: Work in progress. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1575–1584, 2003.

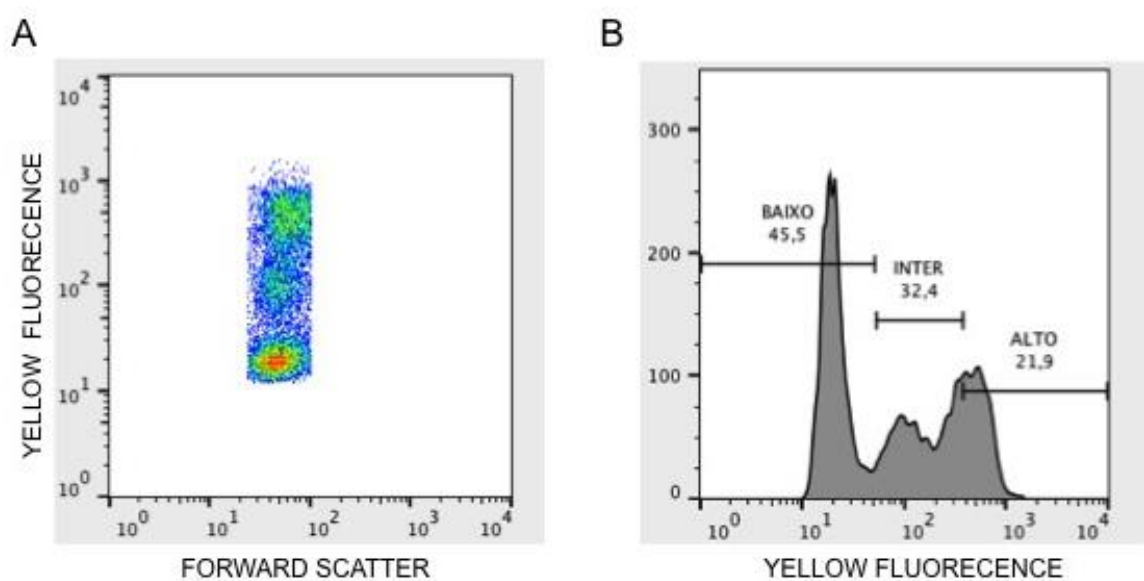
WROBLEWSKI, N.; SCHILL, W. B.; HENKEL, R. Metal chelators change the human sperm motility pattern. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. SUPPL. 3, p. 1584–1589, 2003.

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 89, n. 1, p. 161–174, 1974.

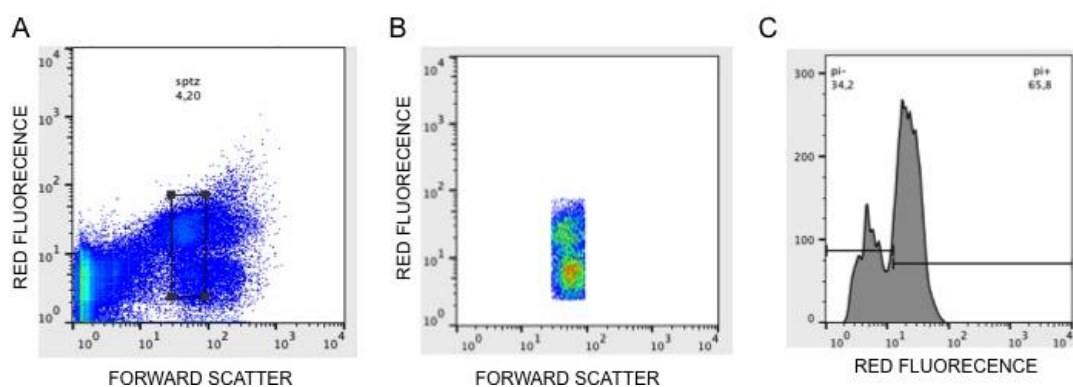
ZHANG, M.; LU, K. H.; SEIDEL, G. E. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, n. 9, p. 1657–1663, 2003.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (sonda fluorescente JC1) no programa Flow Jo®. A. Diagrama de pontos com a população selecionada de espermatozoides em relação à emissão da fluorescência amarela e o tamanho da célula. B. Histograma com a separação das populações espermáticas com alto, baixo e intermediário potencial de membrana mitocondrial pela emissão da fluorescência amarela.

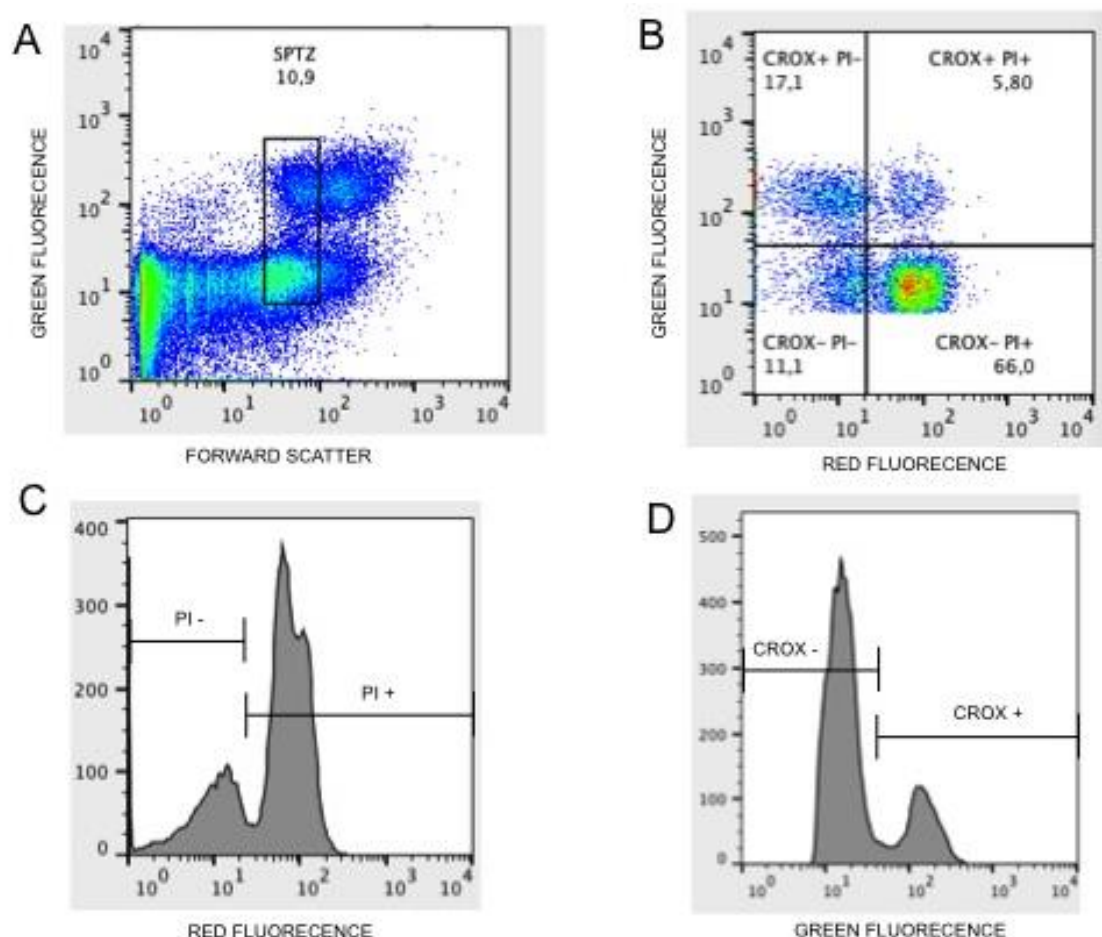


APÊNDICE 2 – A. Avaliação da integridade da membrana plasmática (sonda fluorescente iodeto de propídio) no programa Flow Jo®. A. Diagrama de pontos com a população de espermatozoides a ser selecionada. B. Diagrama de pontos com a população selecionada de espermatozoides em relação à emissão da fluorescência amarela e o tamanho da célula. C. Histograma com a separação das populações espermáticas: membrana plasmática íntegra (pi-) e membrana plasmática lesada (pi+) pela emissão da fluorescência vermelha.





APÊNDICE 3 – A. Avaliação do estresse oxidativo (sonda fluorescente CellROXTM green) no programa Flow Jo®. A. Diagrama de pontos com a população de espermatozoides selecionada pela emissão da fluorescência verde e tamanho celular. B. Diagrama de pontos para separação populações de espermatozoides em relação à emissão da fluorescência verde e vermelha (CROX+Pi+, CROX-Pi+, CROX+Pi-, CROX-Pi-). C. Histograma com a separação das populações espermáticas: membrana plasmática íntegra (PI-) e membrana plasmática lesada (PI+) pela emissão da fluorescência vermelha. D. Histograma com a separação das populações espermáticas: com estresse oxidativo (CROX+) e sem estresse oxidativo (CROX-) pela emissão da fluorescência verde.



## ANEXOS

## ANEXO 1 – PREPARO MEIO HECM-HEPES: MEIO HH

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante/catálogo</b>	<b>mM</b>	<b>Quantidade para 500 mL</b>
NaCl	Sigma S-5886	114	3,331 g
KCl	Sigma P-5405	3,2	0,1195 g
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma S-5761	2	0,084 g
HEPES	Sigma H-6147	10	1,19 g
Phenol Red	Sigma P-0290	.	0,0025 g
MEM aa não essenciais	Sigma M-7145	.	5 mL
Ácido Lático	Sigma L-7900	.	0,72 mL
Ácido Pirúvico	Sigma P-4862	0,1	0,0055 g
BSA	Sigma A-3311	3mg/mL	1,5 g
Pen/Strepto	Gibco 15140-122	.	2,5 mL
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Sigma C-7902	2	0,147 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Sigma M-2393	0,5	0,051 g
Água Miliq		.	500 mL

pH 7.3-7.4

Armazenar a 4°C  
Válido por 1 mês

ANEXO 2 – CONFIGURAÇÃO UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DE CINÉTICA ESPERMÁTICA NO CASA (HAMILTON THORNE – IVOS- 12.2.

<b>IMAGE CAPTURE</b>		
Frames Per Sec.	60 Hz	
No. Of Frames	30	
<b>CELL DETECTION</b>		
Minimum Contrast	80	
Minimum Cell Size	5pix	
<b>DEFAULTS (if &lt; 5 Motile Cells)</b>		
Cell Size	5pix	
Cell Intensity	70	
<b>PROGRESSIVE CELLS</b>		
Path Velocity (VAP)	50 $\mu$ /s	
Straightness (STR)	70 %	
<b>SLOW CELLS</b>		
Slow Cells	Static	
VAP Cutoff	30 $\mu$ /s	
VSL Cutoff	15 $\mu$ /s	
<b>STATIC GATES (on QC Plots)</b>		
<b>MINIMUM</b>		<b>MAXIMUM</b>
0,30	Static intensity gates	1,70
0,10	Static size gates	3,40
8	Static elongation gates	97
<b>ILUMINATION</b>		
Intensity	2.230	
Photometer	74	
<b>MAGNIFICATION</b>	7,73	
<b>VIDEO SOURCE</b>		
Frequency	60Hz	
Field	Dark	
<b>ANALYSIS CHAMBER</b>		
Chamber type	Leja4	
Chamber depth	20 $\mu$ m	
Stage position A	3,9	
Stage position B	11,8	
Stage position C	18,7	
Stage position D	26,6	
<b>FIELD SELECTION</b>	Automatic	
<b>SET STAGE TEMPERATURE</b>	37 graus celsius	