



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**VERÓNICA HOYOS MARULANDA**

**AÇÕES DA BINDER OF SPERM PROTEIN 1 (BSP1) SOBRE A  
FUNCIONALIDADE DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS: REAÇÃO  
ACROSSÔMICA, TAXA DE CLIVAGEM E PRODUÇÃO IN VITRO DE  
BLASTOCISTOS**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2015**

**VERÓNICA HOYOS MARULANDA**

**AÇÕES DA BINDER OF SPERM PROTEIN 1 (BSP1) SOBRE A FUNCIONALIDADE  
DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS: REAÇÃO ACROSSÔMICA, TAXA DE  
CLIVAGEM E PRODUÇÃO IN VITRO DE BLASTOCISTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (UFC).

**Coorientadora:** Dra. Paula Rodríguez Villamil (UFC).

FORTALEZA- CEARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências

Hoyos-Marulanda, Verónica

Ações da Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) sobre a funcionalidade de espermatozoides bovinos: reação acrossômica, taxa de clivagem e produção *in vitro* de blastocistos/ Verónica Hoyos Marulanda, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.

Coorientador: Dra. Paula Rodríguez Villamil.

Área de concentração: Produção e melhoramento animal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Zootecnia, Fortaleza, 2014.

1. BSP1 2. Heparina 3. Fertilizacao *in vitro* 4. Taxa de clivagem 5. Taxa de blastocistos I. Moura, Arlindo de Alencar Araripe (orient.) II. Rodríguez-Villamil, Paula (coorient.) III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia IV. Título

VERÓNICA HOYOS MARULANDA

AÇÕES DA BINDER OF SPERM PROTEIN 1 (BSP1) SOBRE A FUNCIONALIDADE  
DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS: REAÇÃO ACROSSÔMICA, TAXA DE  
CLIVAGEM E PRODUÇÃO IN VITRO DE BLASTOCISTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, do  
Centro de Ciências Agrárias, da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.  
Área de concentração: Produção e  
Melhoramento Animal.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Dra. Paula Rodríguez Villamil  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Jorge André Matias Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais Luis Eduardo Hoyos e Fabiola Marulanda.  
Aos meus irmãos Fabián Hoyos Marulanda e Carolina  
Hoyos Marulanda. Sem vocês isso nunca teria sido  
possível. São meu tudo.

A Elizabeth Gómez Carvajal (*In Memoriam*), grande  
amiga: sempre tentando cumprir meus sonhos na ciência.  
Você ficaria feliz de vê-lo.

(*Dedico*)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luis Eduardo e Fabiola, e meus irmãos Fabián e Carolina, por sempre terem me acompanhado, aconselhado e ensinado que sempre devo sonhar e ir atrás dos meus sonhos. Que desistir nunca será uma possibilidade.

Ao professor Arlindo, meu orientador, pela orientação e amizade. Por sempre ter acreditado em mim, e ter me confiado um projeto de tanto valor como esse.

À Paula, minha coorientadora e sempre amiga. Pela companhia, orientação, incentivo, conselhos e amizade. Por acreditar no meu potencial, por me animar a sempre seguir em frente, mesmo quando muitos não acreditaram; por querer que sempre aprendesse mais, e me lembrar que com compromisso tudo é possível.

Aos professores e membros da banca.

Ao professor Marcelo Bertolini, pela concessão do espaço no Laboratório de Biologia Molecular na UNIFOR; ao Luís Aguiar, pela ajuda e acompanhamento nas rotinas de FIV, e a todos os estudantes e amigos do laboratório que de alguma forma contribuíram nesse trabalho.

Aos funcionários do frigorífico Aguiar, especialmente ao doutor César, pela colaboração e disposição, querendo sempre ajudar na minha pesquisa.

Aos amigos e colegas de profissão, Jorge, Maurício, Ronaldo, e David, que me colaboraram sem dúvidas na execução desse experimento.

À minha amiga Verónica, porque por ela esse sonho foi possível, me ajudando inicialmente a fazer meu estágio na UFC e sempre me apoiar, mesmo na distância; e aos meus professores e amigos da Universidad Nacional de Colombia, por sempre ter acreditado nas minhas capacidades como profissional.

A meus amigos colombianos em Fortaleza, porque apesar de termos conhecido aqui, viramos bons amigos e incondicionais.

Aos meus amigos Santiago Hernández, Filipe Gomes, Lanie Ruiz, Andrés Caro, Laura Álvarez, Alejandro Corrales, Manuel Rincón, e a todos os amigos que fiz em Piracicaba. Na felicidade, tristeza, preocupações, na distância; sei que sempre terei vocês, me apoiando, acreditando sempre em mim...

À Universidade Federal do Ceará (UFC), e ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ).

À CAPES pela concessão da bolsa.

**MUITO OBRIGADA!**



“Para fazer produzir é necessário sair dos escritórios, se internar no campo, sujar as mãos e suar. É a única linguagem que entendem o solo, as plantas e os animais”

(Dr. Norman Borlaug)

## RESUMO

A “Binder of Sperm Protein 1” (BSP1) é uma proteína produzida pelas vesículas seminais dos animais, que ajuda no processo de fertilização do oócito promovendo a capacitação espermática, mediando a sua ligação com o epitélio do oviduto e aumentando sua motilidade no oviduto. As taxas de reação de acrossoma dos espermatozoides foram determinadas ao serem incubados com BSP1 purificado, e com e sem a presença de heparina, como controles. A porcentagem de reação de acrossoma foi maior ( $p < 0.05$ ) no controle 1 (44.5%) comparado com os tratamentos restantes (BSP1: 10  $\mu\text{g/mL}$ : 24.5%; 20  $\mu\text{g/mL}$ : 25.5%; 40  $\mu\text{g/mL}$ : 26.0%), sendo menor esta taxa ( $p > 0.05$ ) quando os espermatozoides só foram incubados no meio Fert-TALP sem heparina (14.5%). As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas nos dias dois e sete respectivamente, depois de fertilizar oócitos em um meio que continha BSP1. Foram recuperados 1274 COCs e incubados durante 18 horas com sêmen ejaculado congelado-descongelado em meio Fert-TALP, que continha: só heparina, 10, 20 ou 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1. As taxas de clivagem e de blastocistos ( $34.1 \pm 4.4$  vs  $40.8 \pm 5.0\%$ ) foram similares ( $p > 0.05$ ) quando se fez a incubação com 10  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1 e heparina, respectivamente. Porém, as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  diminuíram a formação de blastocistos ( $22.4 \pm 2.9$  e  $19.3 \pm 4.1\%$ ) em relação com a heparina ( $40.8 \pm 5.1\%$ ;  $p < 0.02$ ). Posteriormente foram incubados COCs ( $n = 2239$ ), com sêmen ejaculado congelado-descongelado que foi selecionado por um gradiente de Percoll® 45%-90% que continha: só heparina, 10, 20 ou 40  $\mu\text{g/mL}$  de BPS1 e foi realizado um controle 2 de Percoll® sem heparina nem BSP1. A taxa de clivagem foi similar ( $p > 0.05$ ) para a incubação com as concentrações de 10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1 ( $67.7 \pm 3.0$ ,  $68.7 \pm 3.5$ ,  $75.2 \pm 3.8$ ). Porém, estas taxas foram similares quando só foi usada heparina e quando se incubou com 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1 ( $78.9 \pm 1.7$  vs  $75.2 \pm 3.8\%$ ). Para as taxas de blastocistos encontrou-se que foram similares ( $p > 0.05$ ) quando se fez a seleção com heparina ( $44.1 \pm 4.3\%$ ) e com 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1 ( $30.0 \pm 3.3\%$ ). Finalmente, foram recuperados 1213 complexos cumulus-oócitos e incubados com espermatozoides epididimários congelados-descongelados em meio Fert-TALP, que continham: só heparina, sem heparina, e 10, 20 ou 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1.

As taxas de clivagem e de blastocistos foram similares após as incubações com e sem heparina, mas a concentração de 40 µg/mL de BSP1 produziu maiores taxas de clivagem ( $79.0 \pm 1.1\%$ ) que o controle 1 ( $68.5 \pm 1.3\%$ ;  $p < 0.05$ ). Quanto às taxas de blastocistos, encontraram-se maiores taxas quando foram usadas as concentrações de 20 e 40 µg/mL de BSP1 ( $35.6 \pm 2.5$  e  $41.1 \pm 2.0\%$ ) que com ( $24.7 \pm 3.2$ ;  $p < 0.05$ ) e sem heparina ( $27.3 \pm 1.6\%$ ;  $p < 0.0003$ ). Em conclusão, a BSP1 adicionada ao meio de fertilização e ao gradiente de Percoll® quando usado o sêmen ejaculado, e ao meio de fertilização quando usados espermatozoides epididimários, permitiu clivagem e desenvolvimento próprio, sem a necessidade do uso de heparina.

**Palavras-chave:** BSP1, heparina, fertilização *in vitro*, taxa de clivagem, taxa de blastocistos.

## ABSTRACT

The Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) is a protein produced by seminal vesicles of animals. It helps into the fertilization process of oocytes, promoting sperm capacitation, mediating the ligation from itself with the oviduct epithelium, and increasing the motility in the oviduct. When spermatozoa with purified BSP1 were incubated, acrosomal reaction rates were determined with and without the presence of heparin, as controls. The percentage of acrosomal reaction was higher ( $p < 0.05$ ) in control 1 (44.5%) compared with the other treatments (BSP1:10  $\mu\text{g/mL}$ : 24.5%; 20  $\mu\text{g/mL}$ : 25.5%; 40  $\mu\text{g/mL}$ : 26.0 %), and lower the rate ( $p > 0.05$ ) when sperm were incubated only in Fert-TALP medium without heparin (14.5%). Cleavage and blastocyst rates were evaluated on days two and seven respectively, after fertilize oocytes in a medium containing BSP1. 1274 cumulus-oocyte complexes were recovered and incubated for 18 hours with frozen-thawed ejaculated semen in a Fert-TALP medium, containing: only heparin, 10, 20 or 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1. Cleavage and blastocyst rates ( $34.1 \pm 4.4$  vs  $40.8 \pm 5.0\%$ ) were similar ( $p > 0.05$ ) when incubation was made with 10  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1 and heparin, respectively. However, the concentrations of 20 and 40  $\mu\text{g/mL}$  decreased the formation of blastocysts ( $22.4 \pm 2.9$  and  $19.3 \pm 4.1\%$ ) compared with heparin ( $40.8 \pm 5.1\%$ ,  $p < 0.02$ ). Subsequently, cumulus-oocyte complexes ( $n = 2239$ ) were incubated with frozen-thawed ejaculated semen. Spermatozoa were selected by a gradient of 45% -90% Percoll® containing: only heparin, 10, 20, 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1 and there was a control 2 of Percoll® without heparin or BSP1. Cleavage rate was similar ( $p > 0.05$ ) for the incubation with concentrations of 10, 20 and 40  $\mu\text{g/mL}$  of BPS1 ( $67.7 \pm 3.0$ ,  $68.7 \pm 3.5$ ,  $75.2 \pm 3.8$ , respectively). However, these rates were similar when it was used just heparin and when oocytes were incubated with 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1 ( $78.9 \pm 1.7$  vs  $75.2 \pm 3.8\%$ ). For blastocyst rates was found that they were similar ( $p > 0.05$ ) when the selection was made with heparin ( $44.1 \pm 4.3\%$ ) and 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1 ( $30.0 \pm 3.3\%$ ). Finally, 1213 cumulus-oocyte complexes were recovered and incubated with freeze-thawed epididymal semen in Fert-TALP medium, which contained: only heparin, with heparin, and 10, 20 or 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1. Cleavage and blastocyst rates were similar after incubation with and without heparin, but the concentration of 40

$\mu\text{g/mL}$  of BSP1 produced higher cleavages rates ( $79.0 \pm 1.1\%$ ) than control 1 ( $68.5 \pm 1.3\%$ ,  $p < 0.05$ ). About blastocyst rates, there were rates significantly higher when concentrations of 20 and 40  $\mu\text{g/mL}$  of BSP1 were used ( $35.6 \pm 2.5$  and  $41.1 \pm 2.0\%$ ) than with ( $24.7 \pm 3.2$ ;  $p < 0.05$ ) and without heparin ( $27.3 \pm 1.6\%$ ;  $p < 0.0003$ ). In conclusion, BSP1 allowed proper cleavage and development, when the protein was added to the fertilization medium and the Percoll® gradient using ejaculated semen, and to the fertilization medium when used epididymal sperm, without requiring the use of heparin.

**Key words:** BSP1, heparin, *in vitro* fertilization, cleavage rate, blastocyst rate.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Modelo proposto dos eventos intracelulares durante a capacitação do espermatozoide com heparina ..... 31
- Figura 2** – Processo do espermatozoide para induzir a capacitação *in vitro* e detecção da capacitação espermática ..... 32
- Figura 3** – Estrutura das proteínas BSPs ..... 35
- Figura 4** – Imunofluorescência de espermatozoides bovinos epididimários e ejaculados..... 36
- Figura 5** – Padrões de ligação da BSP A1/A2 aos espermatozoides ejaculados..... 36
- Figura 6** – Mecanismo de capacitação espermática bovina pelas proteínas BSP..... 40

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Taxas de reação de acrossoma de espermatozoides ejaculados contendo diferentes concentrações de BSP1..... 58

**Tabela 2** – Taxas de clivagem e blastocistos associadas com os três touros diferentes usados nos estudos de fertilização *in vitro* com sêmen ejaculado ..... 59

**Tabela 3** – Taxas de clivagem e blastocistos depois de que oócitos bovinos maturados *in vitro* fossem fertilizados com espermatozoides ejaculados e um meio Fert-TALP contendo diferentes concentrações de BSP1..... 60

**Tabela 4** – Taxas de clivagem e blastocistos depois de que oócitos bovinos maturados *in vitro* fossem fertilizados em um meio Fert-TALP com espermatozoides ejaculados selecionados por Percoll® contendo diferentes concentrações de BSP1..... 61

**Tabela 5** – Taxas de clivagem e blastocistos após oócitos bovinos maturados *in vitro* serem fertilizados com espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo e um médio Fert-TALP contendo diferentes concentrações de BSP1.....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosine Triphosphate (Adenosina trifosfato)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovina)
BSP	Binder of Sperm Protein (Proteína de Ligação ao Espermatozoide)
AMPC	Cyclic adenosine monophosphate (Monofosfato de adenosina cíclico)
COC	Complexo cumulus oócito
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases (Kinases extracelulares de sinal regulada)
et al	E colaboradores
FCS	Fetal Calf Serum (Soro Fetal Bovino)
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
Fn-II	Fibronectina tipo II
FSH	Follicle-stimulating hormone (Hormônio Foliculo Estimulante)
GAG	Glicosaminoglicano
HBP	Heparin-Binding Protein (Proteína de Ligação à Heparina)
HBPGBP	Proteins with affinity for both heparin and gelatin (Proteínas com afinidade a heparina e a gelatina)



HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
IgG	Imunoglobulina G
LH	Hormônio Luteinizante
NE	Norepinefrina
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fostato Salino)
PC	Phosphatidylcholine (Fosfatidilcolina)
PKA	Proteína Kinase A
PIV	Produção <i>in vitro</i>
RA	Reação de acrossoma
SDS-PAGE 1-D/2-D	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis/ 1º dimensão, 2º dimensão (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)
SOF	Synthetic Oviductal Fluid (Fluido Ovidutal Sintético)
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
TALP	Tyrode's albumin lactate pyruvate
TCM-199	Tissue Culture Medium-199 (Meio de cultivo de tecidos-199)
vs.	Versus
ZP	Zona Pelúcida

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>®</b>	Marca registrada
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Cálcio
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>HCO<sup>3-</sup></b>	Bicarbonato de Cálcio
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>v/v</b>	Relação volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	24
3.2 Capacitação espermática .....	26
3.3 Proteínas BSPs: papel biológico e mecanismo para a capacitação espermática .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
4.1 Avaliação da capacitação espermática.....	46
4.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1.....	47
4.2.1 Adição de BSP1 no meio de fertilização .....	47
a) Coleta dos oócitos .....	47
b) Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos .....	48
c) Fertilização <i>in vitro</i> .....	48
d) Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	49
4.2.2 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®).....	50
a) Coleta dos oócitos .....	50
b) Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos .....	50
c) Fertilização <i>in vitro</i> .....	51
d) Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	52
4.2.3 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários.....	53
a) Coleta e congelamento de espermatozoides epididimários .....	53
b) Coleta dos oócitos .....	54
c) Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	55
d) Fertilização <i>in vitro</i> .....	55
e) Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	56
4.3 Análise estatística .....	57

<b>5 RESULTADOS</b> .....	58
5.1 Avaliação da capacitação espermática .....	58
5.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1.....	59
5.3 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®).....	61
5.4 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários .....	62
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	64
6.1. Avaliação da capacitação espermática .....	65
6.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1.....	66
6.3 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®).....	69
6.4 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários .....	70
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	72
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	73
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

As Binder of Sperm Proteins (BSPs), são proteínas principalmente produzidas pelas vesículas seminais na maioria das espécies, pelo epidídimo em outras; e que além de agir no processo de fertilização *in vivo*, ajudam na capacitação e hipermotilidade espermática por eventos como a estimulação do efluxo de colesterol e fosfolípidios, e a indução da reação de acrossoma (Desnoyers e Manjunath, 1992; Manjunath et al., 1993; Thérien et al., 2001) nos espermatozoides bovinos. Em ruminantes, as BSPs se ligam à membrana espermática durante a ejaculação (Manjunath et al., 1994; Souza, et al., 2008; Van Tilburg et al., 2013) e são conhecidas por promoverem a capacitação (Manjunath e Thérien, 2002). Segundo suas características bioquímicas e estrutura, existem três membros na família das BSPs na espécie bovina, denominadas BSP1 (anteriormente conhecida como BSP-A1/A2 ou PDC-109), BSP3 (também conhecida como BSP-A3) e BSP5 (conhecida como BSP-30 kDa; (Manjunath et al., 2009). A interação desta proteína com a membrana espermática ocorre por uma ligação específica à fosfatidilcolina (Desnoyers e Manjunath, 1992; Thérien et al., 2005), a qual conduz à modificação da composição da membrana lipídica (Thérien et al., 2013). Devido a esta característica, a BSP1 tem a capacidade de estabilizar a membrana espermática durante sua passagem através do trato genital feminino (Manjunath e Thérien, 2002) e para mediar a união do espermatozoide com o epitélio do oviduto (Gwathmey et al., 2003; Hung e Suarez, 2012; Sankhala e Swamy, 2010). Além disso, as BSPs promovem o efluxo de colesterol e fosfolípidios na presença de lipoproteínas de alta densidade ou glicosaminoglicanos como a heparina, melhorando o porcentual de reação de acrossoma e taxas de capacitação (Lusignan et al., 2007; Parrish, 2014; Thérien et al., 1998).

A capacitação é um passo essencial no processo de fertilização devido a que, como seu nome indica, permite que os espermatozoides adquiram total capacidade para fertilizar o oócito (Visconti e Kopf, 1998). Para a fertilização *in vitro* acontecer, encontra-se necessária a simulação das vias fisiológicas que ocorrem no trato reprodutivo feminino para induzir a capacitação espermática. Por tanto, prévios estudos têm reportado o uso

de fatores para induzir a capacitação espermática como os glicosaminoglicanos (GAGs) (Lee e Ax, 1984; Parrish et al., 1989), cálcio extracelular (Aguas e Pinto da Silva, 1983; Visconti et al., 2011), bicarbonato (Harrison e Gadella, 2005), albumina sérica bovina (BSA) (Flesh et al., 2001; Xia e Ren, 2009) e heparina (Parrish, 2014; Parrish et al., 1989), sendo que as moléculas mais comumente utilizadas para a capacitação *in vitro* são a BSA e a heparina, as quais parecem ter efeitos similares com as proteínas BSPs (Plante et al., 2014). Tanto a BSA quanto a heparina são capazes de remover o colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (Parrish, 2014; Xia e Ren, 2009) e seus efeitos também podem ser potencializados na presença de BSP (Parrish, 2014; Thérien et al., 2001; Thérien et al., 1999; Thérien et al., 1997). Porém, as vias fisiológicas pelas quais estes fatores induzem a capacitação espermática, são ainda desconhecidas (Parrish, 2014). Prévios estudos mostram que as proteínas BSPs simulam o efluxo de colesterol e fosfolipídios e induzem a reação de acrossoma (Desnoyers e Manjunath, 1992; Manjunath et al., 1993; Moreau et al., 1998; Thérien et al., 2001; Thérien et al., 1999) em espermatozoides bovinos, mas não existem reportes sobre o efeito de estas proteínas sobre as taxas de fertilização e a produção de embriões *in vitro*. Portanto, graças à ajuda da proteômica, essas proteínas podem ser isoladas (Manjunath et al., 1987), avaliadas (Manjunath et al., 2002) e utilizadas para novas pesquisas e melhoras em diversas áreas da reprodução animal e humana, como se pretende fazer nesta pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da BSP1 na capacitação dos espermatozoides e taxas de fertilização e produção *in vitro* de embriões bovinos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as taxas de reação de acrossoma dos espermatozoides expostos à adição ou não de diferentes concentrações de BSP1,
- Testar a adição de diferentes concentrações de BSP1 no meio de fertilização para determinar taxas de clivagem e de blastocistos utilizando sêmen ejaculado e epididimário.
- Testar a adição de BSP1 no meio de seleção de espermatozoides de sêmen ejaculado com Percoll® sobre as taxas de clivagem e blastocistos na fertilização *in vitro*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção de embriões *in vitro* (PIV) tem sido estudada durante muitos anos, sempre na procura de novas estratégias que ajudem a avanços biotecnológicos para entender processos fisiológicos e melhorar com propósitos comerciais. Esta técnica *in vitro* proporcionou novas oportunidades para os produtores de gado, particularmente na indústria leiteira, para superar a infertilidade e para incrementar a disseminação de animais com alto mérito genético (Machaty et al., 2012).

Desse modo, é importante definir a PIV como uma abordagem que pode aumentar a eficiência da reprodução em uma vaca, sem comprometer a sua vida produtiva. Combinada com as tecnologias desenvolvidas para controlar a função ovárica, o aumento da produção de embriões viáveis por fertilização *in vitro* de oócitos derivados de folículos em crescimento pode provar um método valioso (Bousquet, et al., 1999), com o qual podem ser produzidos em massa embriões a partir de ovários de vacas doadoras, tanto abatidas quanto *in vivo*; ou mesmo sendo uma técnica que tem sido introduzida dentro dos programas de seleção, dado que pode ser implementada em novilhas e vacas gestantes de alto valor genético.

Segundo Hoshi et al., (2003) as técnicas de PIV são atrativas devido às possibilidades para produzir embriões bovinos para transferência em grandes quantidades, diagnóstico de embriões, clonagem de células somáticas e embriões e para a produção de vacas transgênicas, assim como para pesquisas básicas sobre os mecanismos de fertilização e embriogênese, como forma de compreender o que acontece durante o desenvolvimento do embrião normal *in vivo* em bovinos, como trampolins para outras tecnologias, como a transferência nuclear, e como uma ferramenta para examinar o que dá errado no desenvolvimento seguindo tais procedimentos, e inclusive como modelos a partir dos quais podem se extrapolar descobertas para outras espécies (Lonergan, 2008).



Os estudos de FIV em mamíferos foram iniciados em 1878 por Shenk. Posteriormente foi descoberta a necessidade de espermatozoides capacitados em coelhos por Austin (1951) e Chang (1951), a prova definitiva de fertilização *in vitro* em coelhos por Chang (1959). Já em 1977, nasceu o primeiro bovino obtido por FIV com sêmen capacitado no oviduto de uma vaca ou no útero de uma coelha (McKinnon et al., 1992) e o primeiro nascimento humano fertilizado *in vitro* foi em 1978, como resultado do trabalho de Edwards, Steptoe e colaboradores (Steptoe, 1980), o nascimento do primeiro bezerro fertilizado *in vitro* em laboratório (Brackett et al., 1982), a descoberta de que a temperatura ótima para a fertilização *in vitro* de bovinos é 39°C (Lenz et al., 1983) e o desenvolvimento de métodos melhorados para a capacitação *in vitro* de espermatozoides de touro, assim como a utilização de heparina (Parrish et al., 1986), Em 1986 nasceu o primeiro bezerro como resultado de um oócito madurado e fecundado *in vitro*, sendo ele cultivado no oviduto de uma ovelha por um período de 5 dias (Del Campo et al., 1995), e em 1987 nasceram os primeiros bezerros a partir de oócitos madurados, fertilizados e cultivados *in vitro* (Kruip e Dieleman, 1982).

A grandes rasgos, como é descrito por Galli et al., (2003), primeiro são coletados os oócitos, de diferentes tipos de doadoras e por diferentes métodos, sendo que durante a coleta os oócitos são mantidos em PBS Dulbecco ou em TCM-199 (Tamponado com hepes). As condições de maturação utilizadas pela maioria de laboratórios envolvem o uso de TCM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) e gonadotropinas (FSH, LH) em 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38.5°C.

Depois de 20-24 horas de incubação, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpo polar e estão prontos para serem fertilizados. Posteriormente é realizada a seleção de espermatozoides que, como relatado por Machaty et al., (2012), é um tratamento do sêmen antes da FIV que envolve a seleção de células com a melhor motilidade progressiva, e que também remove os espermatozoides indesejáveis, plasma seminal, agentes crioprotetores e outros fatores.

Para realizar a seleção espermática tem sido avaliados diversos métodos como o swim up, a lavagem de espermatozoides, o swim-down ou métodos parecidos com a

sedimentação, a separação de células por um alto gradiente magnético, a centrifugação por Ficoll, a filtração Sephadex, a seleção por fibra de vidro, e o gradiente descontínuo de Percoll (Lessley e Garner, 1983; Parrish et al., 1986; Miltenyi et al., 1990; Drobnis et al., 1991; Graham e Graham, 1990; Kaneko et al., 1980; Katayama et al., 1989).

Posteriormente é realizada a FIV, para facilitar a união dos oócitos maturados com os espermatozoides selecionados e capacitados para formar um zigoto, e para isso, segundo explicado por Galli et al., (2003) as gametas são co-incubadas entre 18 e 20 horas, dentro do meio de fertilização que geralmente pode ser um meio baseado em TALP ou um meio baseado em SOF (Fluido Ovidutal Sintético), ambos sem glicose e com diferentes concentrações de heparina.

Finalmente, segundo os mesmos pesquisadores, passado o tempo da fertilização, os oócitos são completamente desnudados das células do cumulus restantes e os espermatozoides, e são transferidos a um sistema de cultivo adequado para o desenvolvimento embrionário, sendo ele o meio SOF (Tervit et al., 1972). Assim, o desenvolvimento de embriões *in vitro* é usualmente avaliado no dia +6, procurando os embriões que sofreram compactação, e a avaliação e seleção de embriões para transferência ou criopreservação é conduzida no dia +7 (estágio de blastocisto).

### 3.2 Capacitação espermática

A célula espermática sofre de diversas mudanças ou modificações para ela poder fertilizar o oócito, entre as quais estão a formação e o subsequente desenvolvimento da célula na rede testicular por meio da espermatogênese, a maturação do espermatozoide durante seu armazenamento dentro do epidídimo e a capacitação do mesmo dentro do trato genital feminino. Portanto, de maneira geral pode se dizer que um dos passos-chaves da maturação espermática é a capacitação, que pode ser realizada baixo condições *in vivo* ou *in vitro*.

A capacitação é definida como o processo que resulta quando o espermatozoide se torna capaz de fertilizar. As principais respostas observadas são a hiperativação da motilidade espermática (obrigatório para a penetração da zona) e um número de rearranjos na superfície do esperma. Juntos esses processos permitem que o espermatozoide se ligue à zona pelúcida e esta, posteriormente, induz a reação acrossômica e a penetração da ZP para chegar ao oolema (Gadella, 2008).

Para poder ganhar essa capacidade fertilizante, têm que acontecer uma série de eventos de sinalização de células que o espermatozoide sofre, que, como revisado por Visconti et al. (2002), inclui o efluxo de colesterol da membrana plasmática (Suzuki et al., 1989), a hiperpolarização da membrana (Zeng et al., 1995), a ativação de adenilociclases e da proteína quinase A (Visconti et al., 1995), a fosforilação da proteína tirosina (Visconti et al., 1995), e o aumento de cálcio citoplasmático (DasGupta et al., 1993).

Fisiologicamente falando, segundo revisado por Machaty et al. (2012), o principal evento que acontece durante a capacitação, é que as proteínas ligadas da cauda do epidídimo e do plasma seminal são removidas da superfície espermática. Segundo revisado por Jaiswal e Einsenbach (2002), existe uma sequência de sete eventos *in vivo* para que se dê a capacitação das células espermáticas, enunciados embaixo:

- Assim que os espermatozoides são ejaculados são revestidos com fatores decapacitantes originados do plasma seminal e do epidídimo, atingem a cérvix (em espécies cujos espermatozoides são depositados na vagina no coito) ou no segmento inferior do istmo ovidutal (nas espécies onde os espermatozoides são depositados no útero), os fatores decapacitantes são removidos e inicia um processo unidirecional de capacitação.
- Como os espermatozoides ainda não capacitados movem-se até o istmo ovidutal, eles encontram o estreito lúmen contendo elevada quantidade de muco, o que impede a sua progressão, e eles frequentemente entram em contato com o epitélio ovidutal, onde eles se ligam fortemente a unidades de carboidrato, de

glicoproteínas glicolípídeas na superfície do epitélio ovidutal (Suarez, 1998; Suarez et al, 1997). Consequentemente, eles ficam presos e armazenados.

- O processo de capacitação é concluído no istmo do oviduto. No entanto, apenas uma pequena fracção da população espermática sofre capacitação, logo que os fatores decapacitantes são removidos, sendo que o início da capacitação depende não só na supressão de fatores decapacitantes, mas também da idade e / ou pré-programação, propriedades intrínsecas dos espermatozoides individuais.
- A substituição contínua de espermatozoides capacitados ocorre principalmente no reservatório de espermatozoides no istmo do oviduto. O contato com o epitélio do oviduto pode diminuir a taxa da substituição e prolongar a viabilidade espermática.
- Espermatozoides que se tornam capacitados são separados do epitélio do oviduto e são liberados do reservatório ístmico. A hiperativação transitória da motilidade, possivelmente em resposta à progesterona, pode ajudar nessa separação. Na presença de um ócito vizinho (isto é, logo após a ovulação), os espermatozoides no reservatório ou aqueles capacitados e já separados são possivelmente susceptíveis aos efeitos primários das substâncias liberadas do folículo ou a partir do ócito e suas células vizinhas.
- Um espermatozoide capacitado se aproxima à zona pelúcida do ócito através do cumulus oophorus por uma ou mais etapas de quimiotaxia. Além disso, durante este período os espermatozoides podem encontrar progesterona e, consequentemente, adquirir motilidade hiperativada temporariamente. Este padrão de motilidade pode ajudá-los a penetrar as secreções mucosas e ovidutais e o cumulus oophorus.
- Assim que os espermatozoides capacitados fundem-se fora do cumulus oophorus, eles se aderem à superfície da zona pelúcida, sofrem a reação de acrossoma, e

penetram este investimento. O último processo, assim, pode beneficiar a motilidade dos espermatozoides hiperativados.

Assim, segundo o mesmo autor, nas mesmas condições *in vivo*, entre os eventos fisiológicos que acontecem para o espermatozoide se capacitar, estão a remoção dos fatores decapacitantes da membrana espermática (colesterol, polipeptídios aniônicos de 40 KDa), a elevação do pH intracelular (resultado da remoção de colesterol e da presença de  $\text{HCO}_3^-$ ), o aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (sendo que a remoção dos polipeptídios aniônicos de 40 KDa resultam na inibição do  $\text{Ca}^{+2}$  - ATPase e portanto na extrusão reduzida de  $\text{Ca}^{+2}$  e elevada de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular), a ativação da adenilo ciclase (devido ao aumento do pH intracelular, aumento do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e o  $\text{HCO}_3^-$ . Como consequência da ativação da adenilo ciclase, aumenta o nível do AMPc intracelular), a fosforilação da tirosina (desencadeada pelo incremento do nível de AMPc, que ativa o PKA e que leva à fosforilação de proteínas que fosforilam a tirosine quinase, que é ativada e fosforila a tirosina de proteínas específicas, como a ERK-1 e a ERK-2), a redistribuição lipídica na membrana e o aumento da fluidez da membrana e a fusogenicidade (resultado da elevação do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, que inibe enzimas como as flipases que são responsáveis pela distribuição assimétrica de lipídeos na membrana plasmática, além do  $\text{HCO}_3^-$  e o efluxo de colesterol. Eles podem tornar a capa interna da membrana plasmática mais fusogênica para assim, permitir a fusão da membrana durante a reação acrossômica), e por último, a exposição de receptores (as alterações na fluidez da membrana podem resultar na exposição dos receptores quimiotáticos, bem como os receptores reconhecedores da zona pelúcida, incluindo o receptor de manose).

Por outra parte, baixo condições de laboratório a capacitação espermática pode ser realizada *in vitro*, que segundo revisado por Machaty et al., (2012), embora a FIV usando sêmen recuperado de úteros de fêmeas fecundadas, foi reportada em coelhos em 1954 (Thibault, et al., 1954), o sucesso da capacitação *in vitro* dos espermatozoides ejaculados ainda é um desafio técnico; a descendência viva, produzida por FIV utilizando espermatozoides capacitados *in vitro* não foram produzidos se não até duas décadas mais tarde (Brackett e Oliphant, 1975).

Para este fim, os espermatozoides do ejaculado fresco são selecionados através de um gradiente de densidade não só para remover o plasma seminal, mas também para retirar parcialmente os revestimentos extracelulares do esperma. As células lavadas resultantes são misturadas com líquido ovidutal sintético (SOF) no qual a composição do sal, carboidratos, e metabolitos se assemelha com o fluido do oviduto. Além disso, o meio de FIV contém fatores de capacitação como bicarbonato, albumina e cálcio e, em alguns casos, glicosaminoglicanos, que podem ser necessários para a posterior remodelação da superfície para melhorar a capacitação espermática (Chamberland et al., 2001). Esse método de seleção de espermatozoides por Percoll® é o mais utilizado nos laboratórios devido a que tem sido reportado que depois da seleção por Percoll®, foi melhorada a motilidade, a taxa de células com morfologia normal, com membrana e acrossoma intatos (Parrish et al., 1995; Prakrash et al., 1998; Tanghe et al., 2002; Cesari et al., 2006).

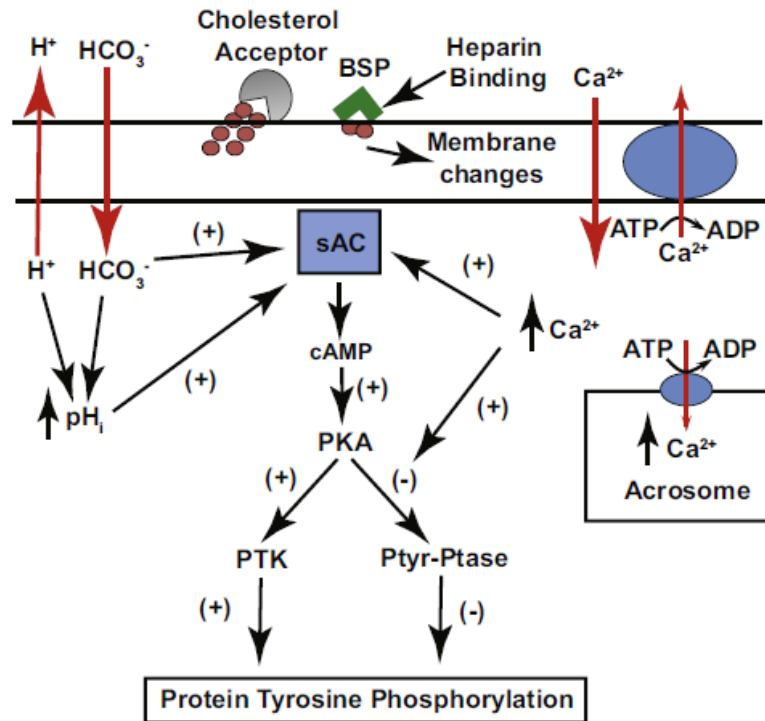
Assim, o tratamento do sêmen bovino ocorre antes de ser realizada a FIV e geralmente envolve a seleção de células com a mais alta motilidade progressiva, além de remover espermatozoides indesejáveis, plasma seminal entre outros, e somente pode ser atingida a partir de técnicas como o gradiente descontínuo de Percoll®, o qual tenta simular o passo dos espermatozoides a través do trato reprodutivo feminino. O Percoll® consiste de partículas coloidais de sílica revestidas com polivinilpirrolidona; a centrifugação do sêmen através de um gradiente de 45% e 90% de Percoll, separa os espermatozoides segundo sua densidade, onde os espermatozoides mais densos (aqueles com boa morfologia nuclear e integridade de membrana) e aqueles com mais motilidade, se deslocarão na camada mais densa do Percoll® (revisado por Machaty et al., 2012).

Segundo (Plante, 2012), a capacitação pode ser induzida *in vitro* incubando os espermatozoides ejaculados, ou da cauda do epidídimo em um meio de capacitação quimicamente definido, que pode ser suplementado com substâncias que dão energia, eletrólitos e um aceptor de colesterol, usualmente albumina. Os meios mais usados, como albumina de soro bovina (BSA), cálcio, e bicarbonato, contêm todos os componentes essenciais para capacitar os espermatozoides.

Como mencionado anteriormente, os glicosaminoglicanos são os fatores mais importantes no processo de capacitação espermática. Entre eles, a mais importante e mais usada é a heparina, pois ela pode acelerar a capacitação do sêmen bovino. Tentando entender um pouco sobre a atuação da heparina, Parrish (2014), sugere que a heparina se liga as proteínas do plasma seminal bovino (BSPs), que se aderem aos espermatozoides epididimários durante a ejaculação. Estas proteínas incluem a BSP-A1, a BSP-A2, a BSP-A3, e a BSP-30-kDa. As BSPs interagem com o colesterol e os fosfolipídios na membrana plasmática do espermatozoide. Depois da ligação com a heparina, há uma perda na ligação da lectina dos espermatozoides bovinos, indicando a perda de componentes da superfície do esperma (Medeiros e Parrish, 1996; Mahmoud e Parrish, 1996). As mudanças nos componentes da superfície provavelmente estão relacionadas a uma perda de BSPs induzida pela heparina ao longo do tempo que conduzem a uma perda de colesterol e fosfolipídios de membrana (Manjunath e Thérien, 2002), além de mudanças no pH intracelular, Ca intracelular, e nos níveis de AMPc.

Segundo o mesmo autor, o cálcio também é importante para a capacitação espermática. A capacitação dos espermatozoides bovinos com heparina requer de cálcio extracelular que é absorvido pelo espermatozoide e leva a um aumento do Ca intracelular na cabeça do espermatozoide (Handrow et al., 1989; Parrish et al., 1999). Além disso, encontra-se que um mínimo de 10 mM/L de bicarbonato é necessário na capacitação ou no meio de fertilização. O espermatozoide contém um adenilato-ciclase solúvel, presente no citoplasma que é estimulado por bicarbonato. Por outra parte, a BSA está quase sempre presente nos meios de capacitação e fertilização. A capacitação induzida pela heparina não precisa de BSA, mas a BSA é necessária para o sêmen bovino capacitado para se submeter à reação do acrossoma. Um modelo que abrange todo o observado sobre os efeitos da heparina no esperma bovino reflete-se no modelo de capacitação na Figura 1.

**Figura 1** - Modelo proposto dos eventos intracelulares durante a capacitação do espermatozoide com heparina. Após este processo, o espermatozoide capacitado fica pronto para sofrer uma reação acrossômica induzida pela zona pelúcida



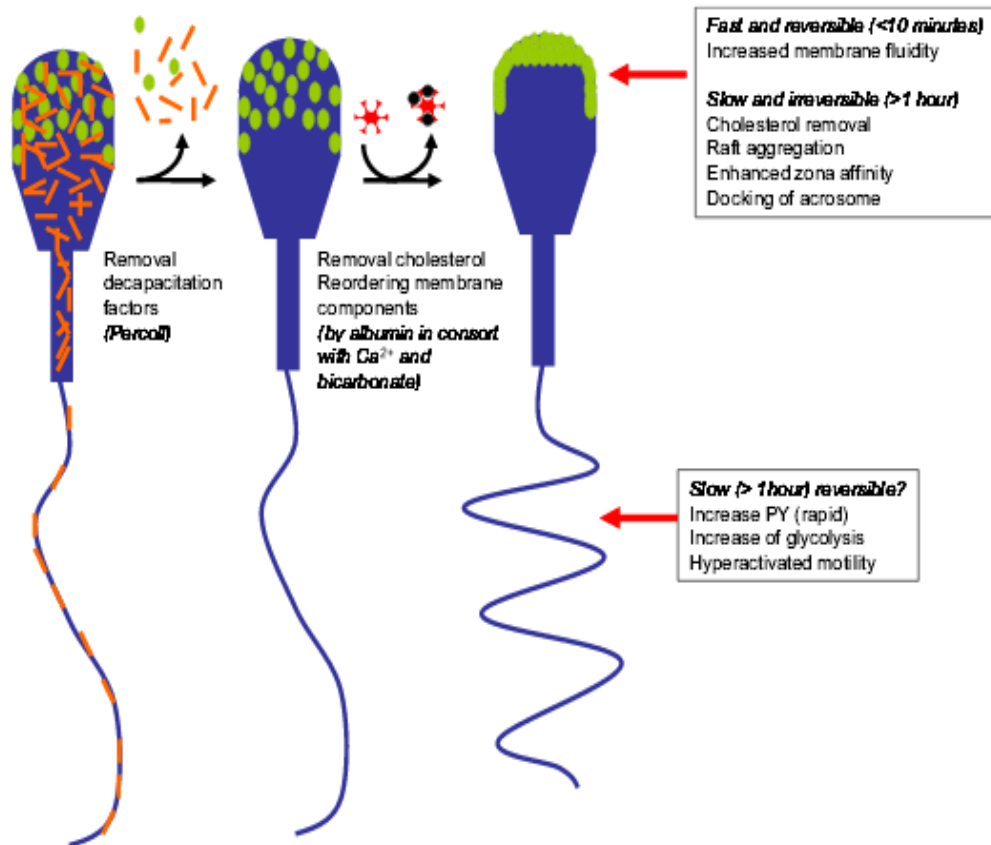
Fonte: Parrish, 2014.

Assim, o produto final serão espermatozoides hiperativados, capazes de se ligarem à zona pelúcida intacta do ócito, para posteriormente sofrer exocitose acrossomal no local de ligação do espermatozoide (Abou-Haila et al., 2009).

Na figura 2, explica-se como acontece o processo para induzir e detectar a capacitação espermática *in vitro*. A remoção do plasma seminal e dos fatores decapacitantes aderidos à superfície dos espermatozoides e colocando-os em um meio de FIV permite respostas do bicarbonato, cálcio e albumina (Gadella et al., 2014).



**Figura 2.** Processo do espermatozoide para induzir a capacitação *in vitro* e detecção da capacitação espermática. A remoção do plasma seminal e dos fatores decapacitantes aderidos à superfície do espermatozoide, e colocando-os em um meio de FIV, permite respostas do bicarbonato,  $\text{Ca}^{2+}$ , e albumina.



Fonte: Gadella et al., 2014.

Portanto, conhecer o papel da capacitação espermática sobre o processo de fertilização do oócito é importante para compreender todas as vias fisiológicas que ocorrem em um animal para determinar como elas podem ser simuladas em um experimento *in vitro*.

### 3.3 Proteínas BSPs: papel biológico e mecanismo para a capacitação espermática

Os espermatozoides epididimários, uma vez unidos com o plasma seminal no momento da ejaculação, ligam-se com um grupo de proteínas que cumprem um papel muito importante dentro do processo de fertilização do oócito. Essas proteínas, produzidas pelas vesículas seminais, são chamadas de BSP (devido a seu primeiro nome

“Bovine Seminal Plasma Proteins” ou Proteínas do Plasma Seminal de Bovinos), inicialmente descritas por Esch et al. (1983). Posteriormente, Manjunath et al., (1987) mudou seu nome para “Binder of Sperm Proteins” ou proteínas que se ligam aos espermatozoides, devido a que foi encontrado que elas unem-se à célula espermática, e que não se encontram somente nos bovinos, mas também têm sido identificadas BSPs homólogas em outras espécies mamíferas, incluindo equinos (Calvete et al., 1995), suínos (Calvete et al., 1997), caprinos (Villemure et al, 2003), bisontes (Boisvert et al., 2004), ovinos (Bergeron et al, 2005), ratos (Leblond et al.,1993) humanos (Lefebvre et al., 2007), e bubalinos (Arangasamy et al., 2005), sendo que em ratos e humanos são expressadas no epidídimo e não nas vesículas seminais como nas demais espécies (Lefebvre et al., 2007).

As BSPs cumprem funções importantes durante o processo de fertilização, devido a que elas podem-se ligar ao espermatozoide via interação com fosfolipídios colina e promovem a capacitação induzida por glicosaminoglicanos (Thérien et al., 2005) e lipoproteínas de alta densidade (Thérien et al., 1997). Assim, entre os principais cargos das BSPs, estão a mediação da ligação do espermatozoide com o epitélio do oviduto, a habilidade para prolongar a supervivência e a mobilidade no oviduto (Gwathmey et al., 2003), evita a movimentação livre dos fosfolipídios, e estabiliza a membrana espermática (Manjunath et al., 2002). A última denominação para cada uma das proteínas BSPs foi dada por Fan et al. (2006) e Manjunath et al. (2009), sendo então designadas como BSP1, BSP3 e BSP5 (sendo antes denominadas por Manjunath et al. (2002) como BSP-A1/A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa). Segundo um estudo realizado por Nauc e Manjunath (2000), foi realizado raioimunoensaio para determinar a concentração das proteínas BSP, encontrando-se que elas representaram entre 40% a 57% das proteínas totais no plasma seminal, sendo que entre o 25 e o 47% eram BSPs-A1/-A2, do 3 ao 5% eram BSPs-A3, e do 3 ao 7% eram BSPs-30 kDa.

Em geral, segundo publicado por (Manjunath et al., 2002), as estruturas primárias das proteínas BSP A1, BSP A2, BSP A3 e BSP 30 kDa contêm dois únicos domínios similares de fibronectina tipo II, que possuem locais de união à heparina (Chandonnet et

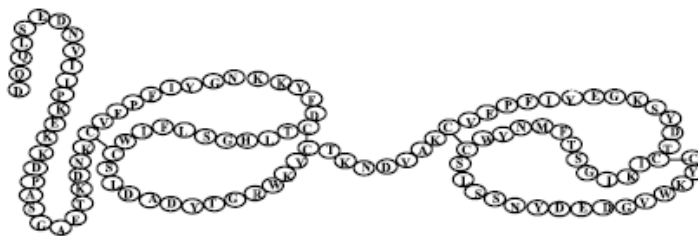
al., 1990) e fosfolipídios (Wah et al., 2002); sendo que cada domínio consiste de 38-41 aminoácidos com duas pontes dissulfeto; além de que também contêm regiões aminoterminais variáveis. Assim, cada uma das proteínas BSP diferenciam-se pelo açúcar que cada uma tem dentro da cadeia, encontrando que a BSP-A1 contém um trisacarídeo (NeuNac-Gal-GalNAc-), a BSP-A2 contém um dissacarídeo (Gal-GalNAc-) e a BSP-30 kDa contém seis trisacarídeos do mesmo tipo que na BSP-A1, como ilustrado na figura 3. Assim, segundo mencionado por (Srivastava, 2013), cada sítio de união da fibronectina tipo II na BSP-A1, parece ser necessário para estimular o efluxo de colesterol devido a que só a ligação do domínio B (que corresponde ao segundo domínio de Fn-II) às membranas não resultam no efluxo lipídico (Moreau et al., 1998). Esta propriedade permite que as proteínas BSP se liguem a heparina, gelatina (Cardin e Weintraub, 1989), lipoproteínas de alta densidade (HDL), fosfolipídios colina e à fração de lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo de galinhas (Thérien et al., 1997). As proteínas BSP estão em uma concentração muito alta no plasma seminal de touros, representando aproximadamente o 86% de todas as proteínas detectadas no fluido das glândulas sexuais acessórias de bovinos (Moura et al., 2007), e uma vez o fluido entra em contato com os espermatozoides, as BSP são adsorvidas sobre a superfície espermática (Desnoyers et al., 1992), as quais ficam localizadas nas regiões acrossomal, pós-acrossomal, e peça média (Manjunath et al., 1994), acompanhando assim à célula espermática até ela se ligar no epitélio do oviduto, onde essas proteínas ajudarão na união do espermatozoide com o oócito para que aconteça o processo de fertilização (revisado por Manjunath, 2002).

**Figura 3.** Estrutura das proteínas BSPs.

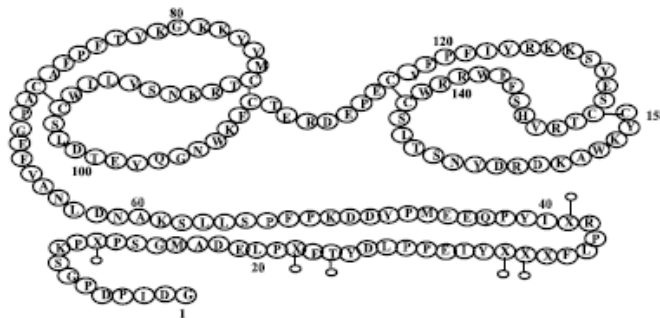
**BSP-A1/-A2 proteins**



**BSP-A3 protein**



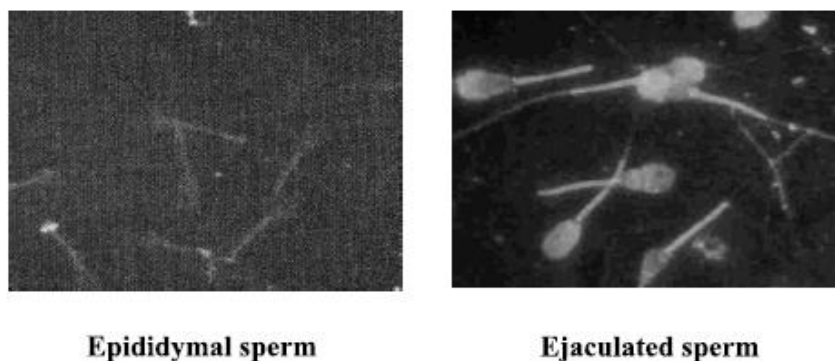
**BSP-30-kDa protein**



Fonte: Manjunath, 2002.

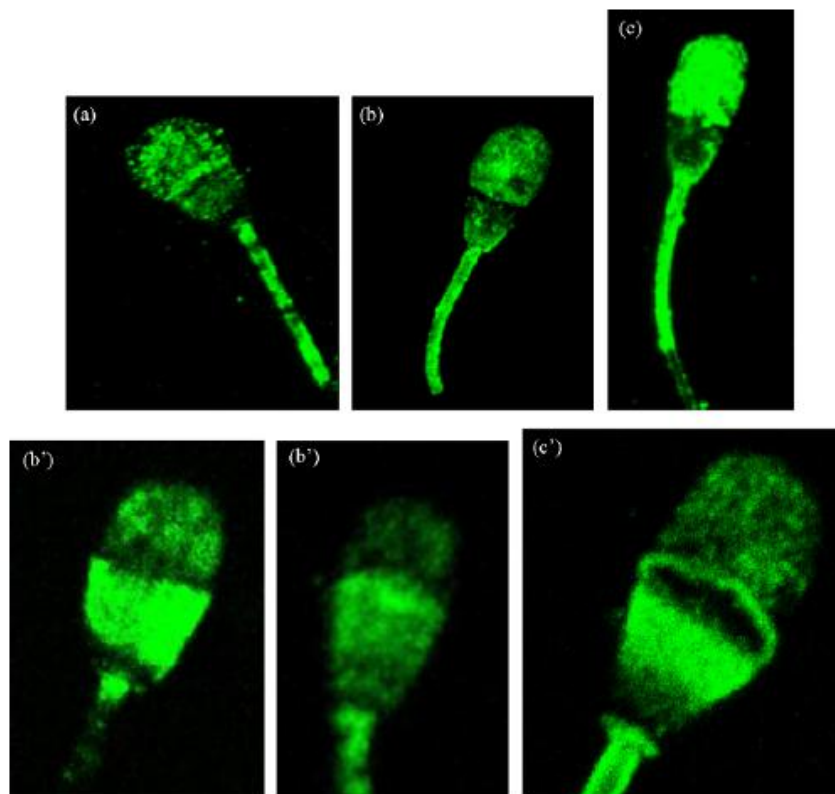
Alguns estudos demonstraram anteriormente que as proteínas BSP ligam-se ao espermatozoide no momento da ejaculação, quando ele é misturado com as secreções das glândulas sexuais acessórias, demonstrando-se na figura 4, onde se ilustra a diferença entre as células espermáticas epididimárias e após a ejaculação por meio de imunofluorescência. Também, Souza et al. (2008), determinaram por imunofluorescência os padrões de ligação da BSP1 aos espermatozoides ejaculados, como se mostra na figura 5.

**Figura 4.** Imunofluorescência de espermatozoides bovinos epididimários e ejaculados, incubados com anticorpos anti-BSP-A1/-A2 e marcados com fluoresceína IgG cabra anti-coelho. Tomado de (Manjunath, 2002),



Fonte: Manjunath, et al., 1994.

**Figura 5.** Padrões de ligação da BSP A1/A2 aos espermatozoides ejaculados. (a) e aos espermatozoides com acrossomas intactos após incubação com fluido ístmico não luteal (b) fluido ampular e (c) fluido ovidutal. A coloração da BSP A1/A2 no espermatozoide com acrossoma não intacto [e mostrado, respectivamente, em (b) e (c)]. A informação foi gerada por imunofluorescência indireta, microscópio de laser de escaneio confocal e os softwares FluoView™ e AutoDeblur softwares.



Fonte: Souza et al., 2009.

Estas proteínas não interagem diretamente com o colesterol, mas inicialmente a ligação toma lugar pela interação de proteínas com fosfatidilcolina (PC), a qual, interagirá com o colesterol. Embora a BSP-A1 não se liga a membranas com ausência de lipídeos colina, ela exibirá algumas, interações com outros fosfolipídios, embora elas sejam mais fracas, tais como fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, bem como o colesterol (Ramakrishnan et al., 2001).

Para garantir que a BSP-A1 extraia os fosfolipídios colina nas membranas das células espermáticas, são precisos dois mecanismos importantes. O primeiro é a interação da BSP-A1 com estes lipídeos (Ramakrishnan et al., 2001), e o segundo é que deve ocorrer a liberação seletiva dos fosfolipídios da membrana mais externa deixando assim uma distribuição assimétrica da bicapa fosfolipídica (Tannert et al., 2007).

Segundo Srivstava (2013), *in vivo*, depois da ejaculação do sêmen e uma curta exposição (entre 20 a 30 minutos) ao fluido seminal (proteínas BSPs), há um pequeno mais significativo efluxo de colesterol. Até a ejaculação, as proteínas BSPs não somente induzem a perda de colesterol, mas também revestem os espermatozoides. Este primeiro efluxo de colesterol induzido pelas proteínas BSP, pode instabilizar levemente a membrana espermática, e esta reorganização da membrana pode resultar na aparência de novos receptores para glicosaminoglicanos tipo heparina (GAGs) ou HDLs (Thérien et al., 1999).

Considerando então o processo da adição das BSPs nas células espermáticas e o consequente efluxo do colesterol com o propósito final de conseguir que eles sejam capacitados, Thérien et al. (2013) propuseram que a BSP A1 juntamente com lipídeos principalmente da capa externa dos espermatozoides, sofrem um rearranjo (que pode incluir a oligomerização destas proteínas), que conduz à formação de conjuntos lipídeos/proteínas que deixam a membrana. O complexo de estequiometria seria, de acordo com os resultados do estudo, entre 9 e 16 lipídeos por BSP-A1. Porém, eles explicam que essa extração de lipídeos é bastante imprecisa, munida da presença de dois PC por BSP-A1 para assegurar a fixação da proteína. Além disso, os autores

explicam que a extração de lipídeos da membrana externa dos espermatozoides, tem que permitir a redistribuição de lipídeos na membrana, a fim de manter a estrutura da bicamada. Tal fenômeno tomaria lugar quando há uma extração de lipídios considerável, o qual pode acontecer quando há um contato prolongado entre a BSP-A1 e as células espermáticas.

Lafleur, M. et al. (2010) avaliaram as interações entre a proteína BSP-A1 e o modelo de membranas composto com fosfatidilcolina, e como elas conduzem a mudanças drásticas na morfologia das auto-ensamblagens lipídicas. Para isso, eles usaram microscopia crio-eletrônica e microscopia de fluorescência, e mostraram que, na presença da proteína, as vesículas lipídicas se alongam e formam estruturas granulosas parecidas a colares que evoluem para pequenas vesículas ou estruturas filiformes. Na presença de vesículas multilamelares, onde um grande reservatório de lipídeos está disponível, a presença de proteínas BSP leva à formação de nanotubos longos, os quais resultam da reorganização de vesículas multilamelares e não da fusão de objetos lipídicos menores. Também são observados longos segmentos semelhantes a espirais, associados com complexos de lipídeos/proteínas. A curvatura local das membranas lipídicas induzida pelas proteínas BSP pode estar envolvida na formação de domínio lipídico e a extração de alguns lipídeos durante o processo de maturação dos espermatozoides. Assim, os autores concluem que a BSP-A1 interage essencialmente com a membrana externa, um processo que leva a mudanças morfológicas. A inserção da BSP-A1 na membrana lipídica externa induz alterações locais na curvatura da bicamada, e elas podem favorecer separações de fases, que poderiam ser posteriormente envolvidas na especificidade do processo de extração de lipídeos.

Posteriormente, as proteínas BSP-A1 cobrem a superfície espermática via sua interação com a PC da membrana espermática. Isto evita a movimentação livre dos fosfolipídios e portanto estabiliza a membrana do espermatozoide (estado detido). Logo depois, os espermatozoides decapitados (cobertos com a BSP-A1 mas sem circulação livre no plasma seminal da proteína mencionada) viajam através do trato reprodutivo feminino. Os HDLs do fluido ovidutal/folicular “acoplam-se” à membrana espermática com

as proteínas BSP-A1 ligadas. Isto remove a proteína BSP-A1 da membrana e como resultado, os lipídeos da membrana espermática, os quais são livres para se movimentar, induzem um segundo efluxo de colesterol e alguns fosfolipídios da membrana espermática, e depois deixam a superfície espermática enquanto se complexam com os HDLs. Devido a que o colesterol é reconhecido como aquele que tem um efeito vital estabilizador sobre as membranas, seu efluxo é esperado para provocar adicional instabilidade da membrana. Esta permeabilidade alterada da membrana espermática permite que o cálcio entre para a ativação da fosfolipase A2. Isto tornaria os fosfolipídios em lisofosfolipídeos que são conhecidos para instabilizar membranas. O influxo de cálcio aumenta a motilidade dos espermatozoides e a eficiência do bombeamento de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases da membrana plasmática de um jeito irreversível e cooperativo.

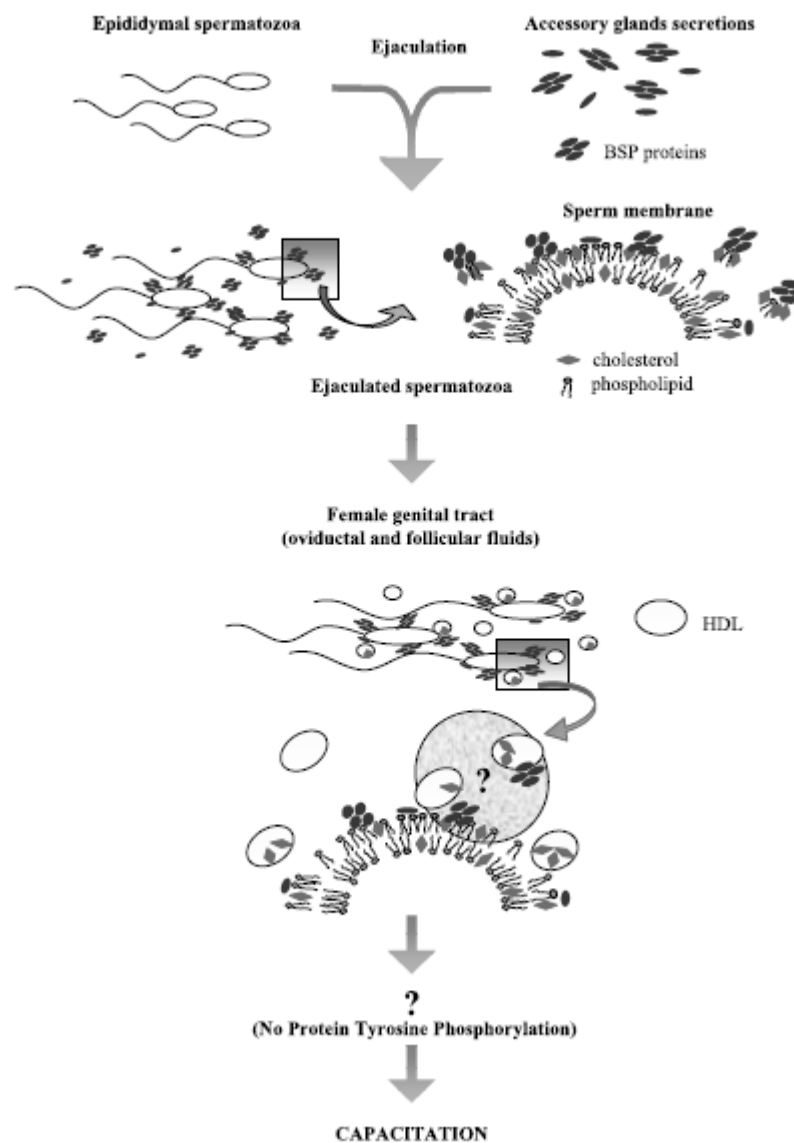
Esta hipermotilidade dos espermatozoides serve para liberá-los do reservatório ovidutal e fornece o essencial motivo necessitado para a penetração da zona pelúcida (ZP). Ao mesmo tempo, a instabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides por meio dos lisofosfolipídeos desencadeia a fusão da membrana. Isto conduz a regulação da expressão dos receptores da ZP. A adesão à ZP desencadeia a reação de acrossoma. Alternativamente, a proteína BSP-A1 tem um papel importante via sua interação com GAGs similares à heparina na captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , na alcalinização intracelular e na fosforilação da tirosina que ocorre durante a capacitação induzida com heparina. Assim, é possível que a proteína BSP-A1 não só decapacita os espermatozoides nos estágios iniciais mas também eventualmente pode promover a capacitação e ajuda no processo de fertilização (Srivastava, 2013).

Assim, a modo de resumo, segundo Manjunath et al. (2002), após a ejaculação os espermatozoides são misturados com as secreções das glândulas sexuais acessórias, as quais contêm as proteínas BSP, que removem colesterol e fosfolipídios. Ao mesmo tempo, as células espermáticas são cobertas pelas proteínas BSP por sua interação específica com os fosfolipídios colina da membrana. Dentro dos 10 a 20 minutos consequentes, os espermatozoides viajam através do muco cervical dentro do útero, deixando atrás a maior parte do fluido seminal. As proteínas BSP junto com o efluxo de



colesterol permitem a reorganização da membrana e a estabiliza; isso acontece para que os lipídios de alta densidade (HDL) presentes no trato reprodutivo feminino possam se ligar e possam capacitar o espermatozoide, como mostrado na figura 6.

**Figura 6.** Mecanismo de capacitação espermática bovina pelas proteínas BSP.



Fonte: Manjunath, 2002.

A perda de colesterol altera a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática do espermatozoide, permitindo assim o influxo de íons como o cálcio e bicarbonato. Este influxo começa uma cascata de eventos sinalizadores (Gadella et al., 2014) que já foram mencionados anteriormente. Além do influxo de íons, ocorre uma perda de colesterol que permite a fluidez da membrana espermática tornando capacitado o espermatozoide.

A maioria das pesquisas têm sido realizadas sobre a BSP A1, devido a seu importante papel na capacitação espermática e a sua alta concentração no plasma seminal, comparado com os outros tipos de BSPs. Alguns estudos foram realizados comparando os grupos de BSPs para analisar as respostas de cada uma delas à capacitação, sendo que Hung (2012) investigou como cada BSP responde às condições capacitantes com o objetivo de determinar se a perda dos três tipos de BSP (A1, A3, 50 KDa) podem servir para liberar o espermatozoide do reservatório, encontrando que cada uma delas responde de uma forma diferente a várias condições de capacitação: a BSP de 50 KDa perdeu-se rapidamente do espermatozoide, a BSP A1 devagar, e a BSP A3 foi encontrada para ser modificada sobre a superfície espermática, o qual sugere que essa perda ou modificação de cada BSP acontece porque existe um mecanismo para regular a mobilidade espermática ao longo do oviduto. É sabido que os espermatozoides testiculares que são liberados ao lúmen do túbulo seminífero, embora estejam maturados, não têm a capacidade de fertilizar o oócito. É só durante o trânsito pelo epidídimo, o contato com o fluido das glândulas sexuais acessórias, e o percorrido do espermatozoide através do trato reprodutivo feminino, que isso irá acontecer.

Outro dos estudos realizados sobre as proteínas BSPs foi completado por D'Amours et al. (2012) quem investigaram a associação da BSP1 e a ELSPBP1 (Proteína de Ligação dos Espermatozoides Epididimários) com os espermatozoides em relação à sua habilidade para sobreviver ao processo de criopreservação. Eles encontraram que a presença de BSP1 sobre a região pós-acrossomal caracteriza os espermatozoides como sensíveis à criopreservação e que a presença de ELSPBP1 caracteriza os espermatozoides que já estão mortos no momento da ejaculação. Além disso, dois anos antes os mesmos autores determinaram que essas proteínas podem modular a

capacidade fertilizante das células espermáticas, sendo que existem diferenças nos índices de fertilidade entre touros. Eles encontraram que, quanto menor fertilidade tinha o touro (menor população imóvel), maior concentração de BSPs tinha, isto provavelmente devido a que esses espermatozoides são mais receptivos as BSPs.

D'Amours et al. (2010) encontraram que as BSPs por si sós, podem promover o efluxo de lipídios e colesterol e que a ELSPBP1 poderia se ligar a membrana espermática e estimular por si mesma efluxos de colesterol, instabilizando assim as membranas. A ELSPBP1 poderia então estar associada com as subpopulações espermáticas imóveis, mas ainda vivas.

Desse modo, encontra-se que as BSPs ao serem determinantes no processo de capacitação espermática poderiam ter um efeito sobre a fertilização em condições *in vitro*, sendo que se faz necessário o entendimento das vias bioquímicas presentes na ligação destas proteínas com os espermatozoides no momento da ejaculação e seu percurso pelo trato reprodutivo feminino, com o propósito de procurar alternativas que possam melhorar as técnicas *in vitro*.

### 3.4 Espermatozoides epididimários: métodos de coleta e características

Sabendo que a cauda do epidídimo nos mamíferos é responsável pelo armazenamento de espermatozoides viáveis até o momento da ejaculação e proporciona um ambiente favorável para a preservação de sua capacidade fertilizante durante várias semanas (Jones, 2004), muitos estudos têm sido realizados usando a coleta e criopreservação de espermatozoides epididimários como uma estratégia para obter novas gerações de animais mortos de alto potencial genético, ou mesmo em via de extinção.

Assim, para a coleta de espermatozoides epididimários, têm sido avaliadas diferentes técnicas na busca de melhores resultados de resgate de espermatozoides vivos e móveis. Alguns estudos têm avaliado o efeito de uma temperatura do 5°C para o

armazenamento de epidídimos, com diferentes períodos de armazenamento (Martins et al., 2009), ou mesmo a temperaturas maiores, entre 18 e 20°C (Bertol et al., 2003).

Outros estudos tem sido realizados na procura de métodos eficientes para a coleta de espermatozoides epididimários. Segundo Martinez-Pastor et al. (2006), um dos primeiros passos em um protocolo de criopreservação de espermatozoides epididimários é recuperá-los da cauda do epidídimo. Existem muitos métodos para sua recuperação, e todos eles variam entre os autores e as espécies, sendo que têm sido criopreservados espermatozoides epididimários de bovinos (Martins et al., 2007), equinos (Cary et al., 2004), caprinos (Blash et al., 2000) e até bisontes (Kozdrowski et al., 2011), entre outros.

Quando trata-se então de animais de pequeno porte, segundo Martinez-Pastor, o método preferido é o método de flotação devido ao tamanho do epidídimo deles, e consiste na trituração ou corte da cauda do epidídimo em um médio tamponado deixando-o durante alguns minutos para que os espermatozoides nadem até o médio e assim possam ser recuperados por filtração do médio cuidadosamente coletado (Wada et al., 1999; Leibo, 2002). Essa técnica também pode ser utilizada para animais de grande porte (Hishinuma et al., 2003). Existe uma técnica similar na qual se realizam numerosos cortes sobre a cauda com uma lâmina, se aperta a cauda gentilmente e se coleta o fluido espermático emergindo dos cortes dos túbulos (Kaabi et al., 2003); e também pode ser usada uma agulha para puncionar os túbulos (Bartels, et al., 2000). Outra técnica largamente usada consiste no flushing retrogrado da cauda do epidídimo, sendo que deve ser aplicada uma pressão por meio de uma seringa contendo algum meio, desde os vasos deferentes até sair o conteúdo da cauda por meio de um corte feito perto da união com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994; 1995), ou mesmo exercendo a pressão somente com ar (Cary et al., 2004).

Finalmente, é importante ressaltar que existem diferenças nas características dos espermatozoides epididimários e os ejaculados. Segundo um experimento realizado por Martins et al. (2007), foram encontradas taxas de motilidade espermática epididimária entre o 70 e 80% comparado com o sêmen ejaculado que foi do 90% quando avaliados em fresco. Assim que foram criopreservados, os espermatozoides epididimários tiveram

uma motilidade após descongelado de entre o 60 e 80%, comparada com o sêmen ejaculado que foi entre o 80 e 90%.

Concluindo, os espermatozoides epididimários, embora tenham características diferentes aos espermatozoides ejaculados, podem ter resultados viáveis de fertilização quando utilizados em momentos de morte repentina de animais de alto potencial ou de espécies em via de extinção, sendo que existem diversas técnicas de recuperação espermática epididimária, escolha determinada principalmente pelo tamanho do animal e preferência do pesquisador.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os químicos foram comprados de Millipore (Billerica, MA, EUA), Nutricell (Campinas, SP, Brasil), Promega (Madison, WI, USA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) utilizada no presente estudo foi purificada do fluido de vesículas seminais de touros *Bos indicus*. Conforme descrito previamente por Martins et al. (2012) para o processo de purificação de BSP1 do plasma seminal bovino, a purificação desta proteína do fluido das vesículas seminais envolveu cromatografia com afinidade à heparina e gelatina e posteriormente confirmação da identidade das frações cromatográficas através de espectrometria de massa e Western blots.

### 4.1 Avaliação da capacitação espermática

Para determinar as taxas de capacitação espermática quando o sêmen é exposto às diferentes concentrações de BSP1, foi realizada a técnica de coloração com Hoechst, como descrito por Esteves et al. (2007), e isotiocianato de fluoresceína (FITC, Pharmigen, San Diego, CA, USA). Assim, o sêmen de uma palheta de 0.25 mL contendo um pool de touros foi exposta a diferentes concentrações de BSP1 na presença do meio de fertilização Fert-TALP, da seguinte maneira: 50 µL Fert-TALP sem heparina + 10 % BSP1, 50 µL Fert-TALP sem heparina + 20% BSP1, 50 µL Fert-TALP sem heparina + 40% BSP1. Como tratamentos controle, utilizou-se 50 µL Fert-TALP sem heparina e sem BSP1; 50 ml Fert-TALP com heparina e sem BSP1. As amostras foram incubadas durante 6 horas, a 38°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, 10 µL das amostras de sêmen foram suspensas em 2 mg/mL da solução Hoechst-33258 e foram incubadas durante 15 minutos em um quarto escuro e posteriormente foram lavadas em solução PBS por centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos para remover o excesso de corante. Vinte e cinco microlitros desta solução

foram subsequentemente esfregadas em lâminas de microscópio e imersas em metanol durante 30 segundos para permeabilizar as membranas espermáticas, e se deixaram secar. Finalmente, as laminas foram imersas em 40 µg/mL da solução FITC, e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos, e lavadas em PBS para remover o excesso. Após secas, a análise foi realizada observando baixo microscópio de fluorescência e avaliando um total de 200 células.

## 4.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1

### 4.2.1 **Adição de BSP1 no meio de fertilização**

#### a) *Coleta dos oócitos*

Para poder produzir embriões *in vitro*, foram coletados ovários provenientes de um abatedouro comercial e se procedeu segundo o método de Guimaraes et al., (2014) com algumas modificações. Os ovários foram cortados e depositados em um recipiente térmico contendo solução salina (0.9% NaCl) a uma temperatura controlada entre 25 e 30°C em um período menor a 2 horas até o seu transporte no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados 3 a 5 horas depois do abate, mediante a técnica de aspiração folicular, com o uso de uma seringa 16G, sendo que os folículos aspirados deviam ter diâmetro de 3 a 8 mm. Após puncionados, os COCs foram levados a um meio de manutenção TCM-199 (Sigma, USA) e observados sob estereomicroscópio, sendo assim avaliados e selecionados segundo os critérios adotados por Hasler et al. (1995). Os COCs com qualidade I, II e III foram selecionados, ou seja, aqueles com três ou mais capas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico.

### *b) Maturação in vitro dos oócitos*

Uma vez selecionados, a maturação foi realizada segundo o procedimento de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Assim, os COCs foram lavados em um meio TCM-199, e transferidos a uma placa de petri em X, em microgotas contendo 150  $\mu$ L do meio de maturação em grupos de 20-25 COCs, para assim serem maturados durante um período de incubação de 24 horas, a 38.5°C, sobre atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de maturação foi o TCM-199 (Sigma, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sódio, 35 mg/mL de FSH (Folltropin-V) e penicilina/estreptomicina (10  $\mu$ L/mL).

### *c) Fertilização in vitro*

- Capacitação dos espermatozoides

Foi usado sêmen convencional criopreservado de 3 touros de fertilidade provada em experimentos de laboratório, todos eles da raça Guzerá. Cada palheta de 0.25 mL foi descongelada durante 45 segundos em banho Maria, a 37°C.

Foi realizada a seleção e capacitação dos espermatozoides através do gradiente de Percoll® na concentração 45% - 90%. O sêmen, uma vez descongelado, foi depositado cuidadosamente em um eppendorf de 500  $\mu$ L na parte superior dos gradientes, e cada amostra foi centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante com o sêmen selecionado foi rediluído em 1 mL do meio de fertilização Fert-TALP (Parrish et al., 1995) para a lavagem dos espermatozoides e as amostras foram centrifugadas a 750 rpm durante 10 minutos, para assim tirar o restante do Percoll®, o qual é tóxico para os espermatozoides. O sobrenadante foi retirado, deixando só o pellet com as células espermáticas lavadas, sendo então analisado para determinar a concentração espermática, e foi rediluído para usar uma alíquota de 10  $\mu$ L com uma concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL.



- Fertilização

As placas que continham os COCs maturados foram retirados da incubadora, e a FIV foi realizada segundo o estudo de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Em cada gota de cultivo de 100  $\mu$ L que continha entre 20 a 25 COCs foram adicionados 10  $\mu$ L do sêmen selecionado e diluído, cobertos com óleo mineral e a uma temperatura de 38.5°C, sobe atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18 horas, para que ocorresse a fecundação. Cada placa continha então 4 gotas, cada uma equivalente a um controle e três tratamentos, conforme descrito a seguir:

Controle: 500  $\mu$ L de Fert-TALP com heparina.

Tratamento 1: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 10  $\mu$ g/mL de BSP1.

Tratamento 2: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 20  $\mu$ g/mL de BSP1.

Tratamento 3: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 40  $\mu$ g/mL de BSP1.

*d) Cultivo in vitro de embriões*

Após 18 horas, os zigotos formados foram desnudados por meio de pipetagem para ajudar na remoção das células do cúmulus, depois lavados uma vez no meio SOF e colocados em micro gotas de 50  $\mu$ L de meio SOF (fluido sintético ovidutal) suplementado com aminoácidos, 1.5 mM de D-glicose e 0.4% de BSA, que foi usado como meio de cultivo, e cobertos por óleo mineral e colocados na incubadora a 38,8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> e máximo de umidade. Foi realizado feeding cada 48 horas para evitar contaminação nas amostras. Assim, os embriões foram observados nos dias 2 e 7 para a determinação dos percentuais de clivagem e de produção de blastocistos e avaliados segundo as recomendações da IETS (Robertson e Nelson, 2011).

#### 4.2.2 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®)

##### a) *Coleta dos oócitos*

Para poder produzir embriões *in vitro*, foram coletados ovários provenientes de um abateudouro comercial e se procedeu segundo o método de Guimaraes et al., (2014) com algumas modificações. Os ovários foram cortados e depositados em um recipiente térmico contendo solução salina (0.9% NaCl) a uma temperatura controlada entre 25 e 30°C em um período menor a 2 horas até o seu transporte no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados 3 a 5 horas depois do abate, mediante a técnica de aspiração folicular, com o uso de uma seringa 16G, sendo que os folículos aspirados deviam ter diâmetro de 3 a 8 mm. Após puncionados, os COCs foram levados a um meio de manutenção TCM-199 (Sigma, USA) e observados sob estereomicroscópio, sendo assim avaliados e selecionados segundo os critérios adotados por Hasler et al. (1995). Os COCs com qualidade I, II e III foram selecionados, ou seja, aqueles com três ou mais capas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico.

##### b) Maturação *in vitro* dos oócitos

Uma vez selecionados, a maturação foi realizada segundo o procedimento de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Assim, os COCs foram lavados em um meio TCM-199, e transferidos a uma placa de petri em X, em microgotas contendo 150 µL do meio de maturação em grupos de 20-25 COCs, para assim serem maturados durante um período de incubação de 24 horas, a 38.5°C, sobre atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de maturação foi o TCM-199 (Sigma, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sódio, 35 mg/mL de FSH (Folltropin-V) e penicilina/estreptomicina (10 µL/mL).

c) *Fertilização in vitro*

- Capacitação dos espermatozoides

Foi usado sêmen convencional criopreservado de um pool de touros de fertilidade provada em experimentos de laboratório, todos eles da raça Guzerá. Cada palheta de 0.25 mL foi descongelada durante 45 segundos em banho Maria, a 37°C. PROCEDEU-SE com a seleção e capacitação dos espermatozoides através do gradiente de Percoll® na concentração 45% - 90%, e a adição de BSP1 nas seguintes concentrações:

Controle: 500 µL de Percoll® sem BSP1.

Tratamento 1: 500 µL de Percoll® + 10 µg/mL de BSP1.

Tratamento 2: 500 µL de Percoll® + 20 µg/ml de BSP1.

Tratamento 3: 500 µL de Percoll® + 40 µg/mL de BSP1.

O sêmen então, uma vez descongelado, foi depositado cuidadosamente em um eppendorf de 500 µL na parte superior dos gradientes com seus respectivos tratamentos, e cada amostra foi centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante com o sêmen selecionado foi ré diluído em 1 mL do meio de fertilização Fert-TALP (Parrish et al., 1995) para a lavagem dos espermatozoides e as amostras foram centrifugadas a 750 rpm durante 10 minutos, para assim tirar o restante do Percoll®, o qual é tóxico para os espermatozoides. O sobrenadante foi retirado, deixando só o pellet com as células espermáticas lavadas, sendo então analisado para determinar a concentração espermática, e foi ré diluído para usar uma alíquota de 10 µL com uma concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

- Fertilização

Os placas que continham os COCs maturados foram retirados da incubadora e a FIV foi realizada segundo o estudo de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Em cada gota de cultivo de 100  $\mu$ L que continha entre 20 a 25 COCs foram adicionados 10  $\mu$ L do sêmen selecionado e diluído, cobertos com óleo mineral e a uma temperatura de 38.5°C, sobe atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18 horas, para que ocorresse a fecundação. Cada placa continha então 5 gotas, cada uma equivalente a um controle e três tratamentos, conforme descrito a seguir:

Controle 1: 500  $\mu$ L de Fert-TALP com heparina + sêmen selecionado por Percoll®

Controle 2: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + sêmen selecionado por Percoll®.

Tratamento 1: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + sêmen selecionado por Percoll® (com 10  $\mu$ g/mL de BSP1).

Tratamento 2: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + sêmen selecionado por Percoll® (com 20  $\mu$ g/mL de BSP1).

Tratamento 3: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + sêmen selecionado por Percoll® (com 40  $\mu$ g/mL de BSP1).

d) *Cultivo in vitro de embriões*

Após 18 horas, os zigotos formados foram desnudados por meio de pipetagem para ajudar na remoção das células do cumulus, depois lavados uma vez no meio SOF e colocados em micro gotas de 50  $\mu$ L de meio SOF (fluido sintético ovidutal) suplementado com aminoácidos, 1.5 mM de D-glicose e 0.4% de BSA, que foi usado como meio de cultivo, e cobertos por óleo mineral e colocados na incubadora a 38,8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> e máximo de umidade. Foi realizado feeding cada 48 horas para evitar

contaminação nas amostras. Assim, os embriões foram observados nos dias 2 e 7 para a determinação dos percentuais de clivagem e de produção de blastocistos e avaliados segundo as recomendações da IETS (Robertson e Nelson, 2011).

#### **4.2.3 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários**

##### a) Coleta e congelamento de espermatozoides epididimários

- Colecta de epidídimos

A coleta de espermatozoides epididimários foi realizada conforme prévios experimentos relatados por Martins et al. (2007), a partir de caudas de epidídimos de 30 touros obtidos em um abatedouro comercial. Todos os animais estavam aproximadamente no mesmo rango de idade, com boa condição corporal e mesma raça (Zebú). Portanto, os escrotos dos animais foram removidos por uma incisão horizontal e transportados ao laboratório a temperatura ambiente. Posteriormente, a pele escrotal foi removida e o excesso de tecido dissecado de ambos os testículos e os epidídimos de cada testículo foram removidos do tecido conectivo, na porção ventral dos vasos deferentes.

- Recuperação e criopreservação de espermatozoides epididimários

Os espermatozoides epididimários foram coletados por retroperfusão dos epidídimos, com Tris o uso de uma seringa com 1 mL de Tris que estava previamente armazenado em banho Maria a 37°C, seguido de pequenas incisões e pressão sobre a cauda do epidídimo. O sêmen que foi recuperado foi armazenado em tubos falcon de 15 mL que continha um diluente de Tris com glicerol e gema de ovo a 37°C (segundo descrito por Gonzalez, 2004. Composição: Tris 2.42 g, ácido cítrico 1.36 g, frutose 1.0 g, gema de ovo 20 mL, glicerol 7 mL, penicilina G 0.028 g, dd.H<sub>2</sub>O - q.s.p 100 mL; osmolaridade = 1432 mOs/Kg H<sub>2</sub>O). Para cada animal, foi misturado o sêmen de ambos os epidídimos. O

sêmen foi carregado em palhetas de 0.5 mL a uma concentração total de  $20 \times 10^6$  células e foram equilibradas a 5°C durante 4 horas. Posteriormente, as palhetas foram submetidas a uma temperatura menor, com vapores de nitrogênio (entre - 80 e - 115 °C) durante 15 minutos e finalmente foram submersas em nitrogênio líquido (- 196 °C) para seu armazenamento. Após a criopreservação, uma palheta de cada touro foi descongelada para confirmar que os espermatozoides epididimários congelado-descongelado tinham uma motilidade adequada.

#### *b) Coleta dos oócitos*

Para poder produzir embriões *in vitro*, foram coletados ovários provenientes de um abatedouro comercial e se procedeu segundo o método de Guimaraes et al., (2014) com algumas modificações. Os ovários foram cortados e depositados em um recipiente térmico contendo solução salina (0.9% NaCl) a uma temperatura controlada entre 25 e 30°C em um período menor a 2 horas até o seu transporte no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados 3 a 5 horas depois do abate, mediante a técnica de aspiração folicular, com o uso de uma seringa 16G, sendo que os folículos aspirados deviam ter diâmetro de 3 a 8 mm. Após puncionados, os COCs foram levados a um meio de manutenção TCM-199 (Sigma, USA) e observados sob estereomicroscópio, sendo assim avaliados e selecionados segundo os critérios adotados por Hasler et al. (1995). Os COCs com qualidade I, II e III foram selecionados, ou seja, aqueles com três ou mais capas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico.

c) Maturação *in vitro* dos oócitos

Uma vez selecionados, a maturação foi realizada segundo o procedimento de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Assim, os COCs foram lavados em um meio TCM-199, e transferidos a uma placa de petri em X, em microgotas contendo 150 µL do meio de maturação em grupos de 20-25 COCs, para assim serem maturados durante um período de incubação de 24 horas, a 38.5°C, sobre atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de maturação foi o TCM-199 (Sigma, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sódio, 35 mg/mL de FSH (Folltropin-V) e penicilina/estreptomicina (10 µL/mL).

d) *Fertilização in vitro*

- Capacitação dos espermatozoides

Foram usados espermatozoides epididimários criopreservados de touros *Bos indicus*. Cada palheta de 0.5 mL foi descongelada durante 45 segundos em banho Maria, a 37°C.

Foi realizada a seleção e capacitação dos espermatozoides através do gradiente de Percoll® na concentração 45% - 90%. O sêmen, uma vez descongelado, foi depositado cuidadosamente em um eppendorf de 500 µL na parte superior dos gradientes, e cada amostra foi centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Depois disso, o supernadante foi descartado e o pellet resultante com o sêmen selecionado foi rediluído em 1 mL do meio de fertilização Fert-TALP (Parrish et al., 1995) para a lavagem dos espermatozoides e as amostras foram centrifugadas a 750 rpm durante 10 minutos, para assim tirar o restante do Percoll®, o qual é tóxico para os espermatozoides. O supernadante foi retirado, deixando só o pellet com as células espermáticas lavadas, sendo então analisado para determinar a concentração espermática, e foi rediluído para usar uma alíquota de 10 µL com uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

- Fertilização

As placas que continham os COCs maturados foram retirados da incubadora e a FIV foi realizada segundo o estudo de Guimaraes et al. (2014) com algumas modificações. Em cada gota de cultivo de 100  $\mu$ L que continha entre 20 a 25 COCs foram adicionados 10  $\mu$ L do selecionado e diluído, cobertos com óleo mineral e a uma temperatura de 38.5°C, sobe atmosfera de umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18 horas, para que ocorresse a fecundação. Cada placa continha então 5 gotas, cada uma equivalente a um controle e três tratamentos, conforme descrito a seguir:

Controle 1: 500  $\mu$ L de Fert-TALP com heparina.

Controle 2: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina, nem BSP1.

Tratamento 1: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 10  $\mu$ g/mL de BSP1.

Tratamento 2: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 20  $\mu$ g/mL de BSP1.

Tratamento 3: 500  $\mu$ L de Fert-TALP sem heparina + 40  $\mu$ g/mL de BSP1.

Tendo em conta que foram coletados espermatozoides epididimários de touros diferentes, para cada rotina de FIV que foi realizada semanalmente UTILIZOU-SE palhetas de um touro diferente, mas sempre usando o mesmo touro entre os tratamentos.

e) *Cultivo in vitro de embriões*

Após 18 horas, os zigotos formados foram desnudados por meio de pipetagem para ajudar na remoção das células do cumulus, depois lavados uma vez no meio SOF e colocados em micro gotas de 50  $\mu$ L de meio SOF (fluido sintético ovidutal) suplementado com aminoácidos, 1.5 mM de D-glicose e 0.4% de BSA, que foi usado como meio de



cultivo, e cobertos por óleo mineral e colocados na incubadora a 38,8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> e máximo de humidade. Foi realizado feeding cada 48 horas para evitar contaminação nas amostras. Assim, os embriões foram observados nos dias 2 e 7 para a determinação dos percentuais de clivagem e de produção de blastocistos e avaliados segundo as recomendações da IETS (Robertson e Nelson, 2011).

#### 4.3 Análise estatística

Os dados obtidos da avaliação da reação de acrossoma por tratamento foram analisados usando chi quadrado (software GraphPad), considerando-se como diferentes significativamente quando  $P < 0.05$ . MUDAR AQUI. Os dados dos experimentos da FIV, foram analisados usando o software Infostat (UNC, Argentina, 2010), e  $P < 0.05$  foi usado em todos os testes para significância estatística. As taxas de clivagem e blastocistos foram analisadas pelo ANOVA após seres transformadas pela raiz quadrada, sendo que os efeitos principais e suas interações foram os touros e as diferentes concentrações de BSP1. O test LSD (diferença mínima significativa protegida) foi usado para as subseqüentes comparações quando o ANOVA mostrou diferenças estatisticamente significativas.

## 5 RESULTADOS

Em resumo, foram realizados quatro experimentos: o primeiro consistiu na avaliação da capacitação espermática, por meio da incubação com FITC- Hoescht quando o sêmen foi exposto à proteína BSP1. O segundo consistiu na adição de diferentes concentrações de BSP1 no meio de fertilização sem heparina, com três touros diferentes, para determinar se existe ou não o efeito touro, sendo o controle a FIV sem a adição de BSP1 mas com a adição de heparina no meio de fertilização. Já no terceiro experimento, foi realizada a seleção por Percoll® dos espermatozoides obtidos de palhetas com um pool de touros, mas dessa vez com a adição de diferentes concentrações de BSP-1 no Percoll® e não, no meio de fertilização. Neste caso, adotaram-se controles com o meio de fertilização com e sem heparina, ambos sem a adição de BSP1 no gradiente de Percoll®. No último experimento foram adicionadas diferentes concentrações de BSP1 com os controles com e sem heparina no meio de fertilização, utilizando palhetas de espermatozoides epididimários previamente coletados para a fertilização.

### 5.1 Avaliação da capacitação espermática

Nesse experimento, avaliou-se a capacitação espermática por meio da detecção da reação de acrossoma. Desta forma, a percentagem de células com reação de acrossoma foi maior (44.5%;  $p < 0.05$ ) após o tratamento com heparina do que em presença de BSP1 (24.5%, 25.5%, 26.0%) ou sem heparina (14.5%; tabela 1). Porém, foi encontrado que o efeito da adição de todas as concentrações de BSP1 sobre a reação de acrossoma de espermatozoides ejaculados foi equivalente ao grupo de espermatozoides na ausência de heparina.

**Tabela 1.** Taxas de reação de acrossoma de espermatozoides ejaculados contendo diferentes concentrações de BSP1.

<b>Tratamento</b>	<b>%R.A</b>
Controle 1	44.5 <sup>a</sup>
Controle 2	14.5 <sup>b</sup>
BSP1 (10µg/mL)	24.5 <sup>b</sup>
BSP1 (20µg/mL)	25.5 <sup>b</sup>
BSP1 (40µg/mL)	26.0 <sup>b</sup>

## 5.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1

Os dados de touros, número de oócitos coletados por tratamento e taxas de clivagem e blastocistos são apresentados na Tabela 2. Os resultados sobre tratamentos, número de oócitos coletados por tratamento, e taxas de clivagem e blastocistos para a adição de BSP1 no meio de fertilização são apresentados na Tabela 3. As duas tabelas fazem parte do mesmo experimento, mas os dados foram separados com a intenção de demonstrar graficamente as taxas de fertilidade de cada um dos touros. As taxas de clivagem foram equivalentes em todos os animais. Porém, com relação à formação de blastocistos, não foi encontrada diferença significativa entre os touros B1 e B2, nem entre os touros B2 e B3, mas sim entre os animais B1 e B3 (35.2±3.1% vs. 20.3±5.4%, respectivamente,  $p < 0.02$ ).

**Tabela 2.** Taxas de clivagem e blastocistos associadas com os três touros diferentes usados nos estudos de fertilização *in vitro* com sêmen ejaculado

TOURO	OÓCITOS	% CLIVAGEM	%BLASTOCISTOS
B1	425	74.9±2.8 <sup>a</sup>	35.2±3.1 <sup>a</sup>
B2	422	72.2±3.0 <sup>a</sup>	29.9±4.2 <sup>ab</sup>
B3	427	67.1±2.9 <sup>a</sup>	20.3±5.4 <sup>b</sup>

As médias dentro da mesma coluna com diferente superíndice são diferentes significativamente,  $p < 0.05$

Para as taxas de clivagem encontra-se que não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos controle, T1 e T2, nem para os grupos controle, T2 e T3; mas sim para os grupos T1 e T3, sendo maior para T1 (77.8±3.1% de oócitos clivados, usando Fert-TALP sem heparina + 10 µg/mL de BSP1) e menor para T3 (65.9±2.6% de oócitos clivados usando Fert-TALP sem heparina + 40 µg/mL de BSP1; tabela 3).

Comparado com os resultados das taxas de clivagem, as taxas de blastocistos foram equivalentes nos tratamentos controle (Fert-TALP com heparina) e T1 (Fert-TALP sem heparina + 10 µg/mL de BSP1). No entanto, as incubações do meio Fert-TALP com 20 e 40 µg/mL de BSP1 causaram reduções na formação de blastocistos em comparação com os grupos controle e T1, respectivamente.

**Tabela 3.** Taxas de clivagem e blastocistos depois de que oócitos bovinos maturados *in vitro* fossem fertilizados com espermatozoides ejaculados e um meio Fert-TALP contendo diferentes concentrações de BSP1.

TRATAMENTO	OÓCITOS	% CLIVAGEM	%BLASTOCISTOS
Controle	325	74.1±2.7 <sup>ab</sup>	40.8±5.07 <sup>a</sup>
T1	316	77.8±3.1 <sup>a</sup>	34.1±4.4 <sup>ab</sup>
T2	313	74.0±2.0 <sup>ab</sup>	22.4±2.9 <sup>bc</sup>
T3	320	65.9±2.6 <sup>b</sup>	19.3±4.1 <sup>c</sup>

**Controle:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP com heparina; **T1:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP sem heparina + 10 µg/mL de BSP1; **T2:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP sem heparina + 20 µg/mL de BSP1; **T3:** oócitos fertilizados no meio Fert-TALP sem heparina + 40 µg/mL de BSP1.

As medias dentro da mesma coluna com diferente superíndice são diferentes significativamente,  $p < 0.05$ .

### 5.3 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®)

As taxas de clivagem foram mais elevadas ( $p < 0.02$ ) após o tratamento com heparina do que na ausência deste componente (78.9±1.7% vs. 64.2±1.8% respectivamente; tabela 5). No entanto, não houve diferença entre os tratamentos 1, 2 e 3. Estas taxas foram similares entre o grupo controle 1 e a mais alta concentração de BSP1 (40 µg/mL; 75.2±3.8%); e entre o grupo controle 2 e as concentrações de BSP1 de 10 µg/mL e 20 µg/mL (67.7±3.0% e 68.7±3.5).

Os resultados foram similares com relação às taxas de blastocistos. Neste caso, o melhor resultado foi obtido após a incubação com heparina (44.1±4.3%), valor mais elevado ( $p < 0.02$ ) do que nos grupos controle 2, T1 e T2. Porém, a adição de 40 µg/mL de BSP1 proporcionou formação de blastocistos (30.0±3.3%) equivalente àquela observada no grupo com heparina. Tratamentos que incluíram 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL não apresentaram taxas de blastocistos com diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Taxas de clivagem e blastocistos depois de que oócitos bovinos maturados *in vitro* fossem fertilizados em um meio Fert-TALP com espermatozoides ejaculados selecionados por Percoll® contendo diferentes concentrações de BSP1.

TRATAMENTO	OÓCITOS	%CLIVAGEM	%BLASTOCISTOS
Controle 1	192	78.9±1.7 <sup>a</sup>	44.1±4.3 <sup>a</sup>
Controle 2	192	64.2±1.8 <sup>b</sup>	22.2±1.9 <sup>b</sup>
T1	195	67.7±3.0 <sup>ab</sup>	21.9±2.9 <sup>b</sup>
T2	193	68.7±3.5 <sup>ab</sup>	22.3±3.0 <sup>b</sup>
T3	193	75.2±3.8 <sup>ab</sup>	30.0±3.3 <sup>ab</sup>

**Controle 1:** espermatozoides selecionados por Percoll® e fertilizados com heparina; **Controle 2:** espermatozoides selecionados por Percoll® e fertilizados sem heparina; **T1:** espermatozoides selecionados por Percoll® + 10 µg/mL de BSP1; **T2:** espermatozoides selecionados por Percoll® + 20 µg/mL de BSP1; **T3:** oócitos selecionados por Percoll® + 40 µg/mL de BSP1; As médias dentro da mesma coluna com diferente superíndice são diferentes significativamente,  $p < 0.05$ .

#### 5.4 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários

Quando os oócitos foram fertilizados com espermatozoides epididimários, observou-se que a adição de heparina não exerceu efeito sobre as taxas de clivagem e blastocistos em comparação com o tratamento sem heparina ( $p > 0.05$ ; Tabela 6). Porém, quando os oócitos foram fertilizados com Fert-TALP e diferentes concentrações de BSP1 houve melhores taxas de clivagem do que o controle 2, (T1: 74.2 ± 2.7%, T2: 74.0 ± 1.6%, T3: 79.0 ± 1.1%, vs. controle 2: 65.5 ± 1.8%,  $p < 0.05$ ). Todas as concentrações de BSP1 melhoraram o crescimento de blastocistos quando comparadas com o controle 1 somente ( $p < 0.05$ ). Comparado com o meio Fert-TALP sem heparina, os tratamentos com 20 e 40 µg/mL de BSP1 induziram melhores taxas de blastocistos (controle 2: 27.3 ± 1.6 vs. T2: 35.6 ± 2.5%, T3: 41.1 ± 2.0;  $p < 0.0003$ ).

**Tabela 5.** Taxas de clivagem e blastocistos após oócitos bovinos maturados *in vitro* serem fertilizados com espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo e um médio Fert-TALP contendo diferentes concentrações de BSP1.

TRATAMENTO	OÓCITOS	% CLIVAGEM	% BLASTOCISTOS
Controle 1	244	68.5 ± 1.3 <sup>bc</sup>	24.7 ± 3.2 <sup>c</sup>
Controle 2	242	65.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	27.3 ± 1.6 <sup>bc</sup>
T1	240	74.2 ± 2.7 <sup>ab</sup>	33.2 ± 1.1 <sup>ab</sup>
T2	242	74.0 ± 1.6 <sup>ab</sup>	35.6 ± 2.5 <sup>a</sup>
T3	245	79.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	41.1 ± 2.0 <sup>a</sup>

**Controle 1:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP com heparina; **Controle 2:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP sem heparina; **T1:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP sem heparina + 10 µg/mL de BSP1; **T2:** oócitos fertilizados com o meio Fert-TALP sem heparina + 20 µg/mL de BSP1; **T3:** oócitos fertilizados no meio Fert-TALP sem heparina + 40 µg/mL de BSP1. As médias dentro da mesma coluna com diferente superíndice são diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avalia os efeitos da “Binder of Sperm Protein” 1 sobre a reação de acrossoma de espermatozoides ejaculados, e sobre a fertilização de oócitos maturados *in vitro*. A estratégia implementada foi a adição de diferentes concentrações de BSP1 purificada ou de heparina sobre células espermáticas ejaculadas para determinar as taxas de reação de acrossoma. Também foi avaliada a inclusão de diferentes quantidades de BSP1 no meio de fertilização, quando usados espermatozoides ejaculados e epididimários; e a adição das mesmas concentrações de BSP1 no meio de seleção espermática por Percoll® e sua posterior fertilização no meio Fert-TALP.

O plasma seminal é uma secreção complexa de íons inorgânicos, açúcares, sais orgânicos, lipídeos, enzimas, prostaglandinas, e outros fatores produzidos pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (próstata, e glândulas vesicular, âmpula e bulbouretrais) do macho (Maxwell et al., 2007). Alguns componentes deste plasma, particularmente proteínas, possuem efeitos sobre a maturação espermática (Dacheux, et al., 1998), estabilização da membrana espermática e capacitação (Manjunath e Thérien, 2002), interação com o oviduto (Gwathmey et al., 2006) e o oócito (Töpfer-Petersen et al., 1998). As “Binder of Sperm Proteins” compreendem aproximadamente o 60% de todas as proteínas presentes no fluido das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007) e no plasma seminal (Manjunath e Sairam, 1987) de touros *Bos taurus* e aproximadamente a mesma quantidade no plasma seminal de touros *Bos indicus* (Rêgo et al., 2014; resultados não publicados). A BSP1 é a mais abundante de todas as BSPs bovinas, contém 109 aminoácidos na sua forma madura (Manjunath e Sairam, 1987) e possui dois domínios Fn2, unidos por um ligador (Manjunath e Therien, 2002; Seidah et al., 1987). A BSP1 é uma típica proteína das glândulas sexuais acessórias e não existem reportes da sua expressão no epidídimo bovino (Moura et al., 2007, Moura et al., 2010, Thérien et al., 1995). As BSPs têm a capacidade de se ligar aos espermatozoides no momento da ejaculação, permitindo o efluxo de colesterol da membrana espermática e o aumento de cálcio intracelular e de bicarbonato, eventos



associados à capacitação. Dado que as BSPs contribuem para a capacitação espermática e ligam-se aos espermatozoides mesmo após o contato com as secreções do fluido do oviduto e após a reação acrossômica (Souza et al., 2008), sugere-se, portanto, que tais proteínas também participem no processo de fertilização. Em função deste contexto, o presente estudo avalia os efeitos da “Binder of Sperm Protein” 1 sobre parâmetros da funcionalidade espermática e fertilização de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Para meu conhecimento, esta é a primeira descrição dos efeitos da BSP1 sobre a taxa de clivagem dos zigotos e sobre o crescimento de blastocistos após a fertilização *in vitro* com espermatozoides ejaculados e epididimários.

#### 6.1. Avaliação da capacitação espermática

No estudo inicial, verificou-se que o efeito da BSP1 sobre a reação de acrossoma com espermatozoides ejaculados foi reduzido em comparação com o uso de heparina, e quando o experimento foi realizado com adição de BSP1 ou heparina no meio de fertilização Fert-TALP, as taxas de clivagem e de blastocistos foram equivalentes. De Cuneo et al., (2004), detectaram ao redor do 12% de células espermáticas com acrossoma reagido quando eles foram incubados com heparina; mas isto foi aproximadamente dobrado na presença de BSP1. Portanto, eles sugeriram que a proteína mencionada poderia induzir o fenômeno exocitótico, talvez via um mecanismo não específico que não foi dependente em consequência da interação com os receptores de membrana. Controversamente com o De Cuneo e colaboradores, em este estudo foram encontrados o 44.5% de espermatozoides com acrossoma reagido quando foram expostos só a heparina e a proporção foi aproximadamente reduzida pela metade quando eles foram expostos às diferentes concentrações de BSP1 (24.5, 25.5 e 26.0% respectivamente). Isto pode ser devido ao tempo de exposição à heparina e à proteína BSP1 dada neste experimento que foi de 6 horas comparado com as 4 horas de incubação no estudo de De Cuneo. Finalmente, detectou-se uma ligeira tendência ao

aumento das taxas de reação de acrossoma com cada aumento das concentrações de BSP1, o que poderia sugerir que se o tempo de incubação e as concentrações de BSP1 aumentassem, os espermatozoides provavelmente atingiriam valores similares com aqueles obtidos com a incubação com heparina.

## 6.2 Avaliação das taxas de fertilização dos espermatozoides expostos à BSP1

No seguinte experimento, quando foi avaliado o efeito da adição da BSP1 sobre as taxas de fertilização após utilizado sêmen ejaculado de três touros diferentes, não se encontrou diferença estatística entre os animais, sem importar as diferenças nas concentrações de BSP1; mas sim quanto às taxas de produção de embriões. Porém, é importante destacar que existe uma correlação entre as taxas de fertilidade e de sobrevivência dos espermatozoides após descongelados (D'Amours et al., 2012; Souza et al., 2008) quando comparados entre touros, devido a que entre eles existem diferenças nas quantidades e padrões de ligação das BSP1. Essas diferenças provavelmente foram encontradas no experimento devido ao fato de que o sêmen ejaculado pós-descongelado já vem com BSP1 ligada à membrana espermática e talvez, a proteína exógena adicionada surtiu um efeito diferente para cada animal. Este efeito da adição de BSP1 exógeno sobre a produção *in vitro* de embriões, encontra-se similar quando a heparina é adicionada no meio de fertilização, incrementando assim as taxas de fertilização e blastocistos apesar das taxas de fertilização dos touros (Lu e Seidel Jr., 2004; Mendes Jr. et al., 2003). Quando a adição de BSP1 foi comparada com o controle 1 (Fert-TALP + heparina) dentro do meio de fertilização, encontrou-se que a BSP1 teve um efeito similar sobre o sêmen ejaculado. Isto poderia ser devido a que a BSP1 talvez teve sua própria habilidade de induzir a capacitação espermática, em taxas comparáveis com a heparina, devido aos resultados de clivagem encontrados (controle 1:  $74.1 \pm 2.7$ , tratamentos:  $77.8 \pm 3.1$ ,  $74.0 \pm 2.0$ ,  $65.9 \pm 2.6$ ). Assim surge a hipótese de que a BSP1 é análoga à BSA, aumentando então a reação de acrossoma dos espermatozoides devido a uma depleção de colesterol da membrana dos mesmos (Gadella e Luna, 2014). Estudos *in vitro* demonstram que a BSP1 induz o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana

plasmática, que leva à reação de acrossoma (Thérien et al., 2005; Thérien et al., 1995; Thérien et al., 1999).

Quando foram usadas concentrações de BSP1 maiores do que 10 µg/mL (20 e 40 µg/mL) dentro do meio de fertilização, a taxa de blastocistos diminuiu. Embora a razão deste efeito é ainda desconhecida, isto pode ser provavelmente devido a que a proteína em altas concentrações pode gerar um dano induzido sobre os espermatozoides, os COCs e/ou sobre o embrião, durante o período de fertilização (18 horas). Segundo Moura et al., (2006), o conteúdo de BSP 30 KDa (agora conhecida como BSP5) dentro do fluido das glândulas sexuais acessórias tem uma relação quadrática com a fertilidade dos touros. Isto pode sugerir então que uma alta quantidade de BSP é prejudicial para o espermatozoide, o processo de fertilização e/ou o desenvolvimento embrionário, como aconteceu no presente estudo. De Cuneo et al., (2004), determinaram os efeitos da BSP1 exógena adicionada *in vitro* durante um período de 4 horas e em concentrações mais baixas do que aquelas presentes no plasma seminal todo. Eles concluíram que, quando usada a BSP1 em lugar da heparina, houve diminuições significativas nas porcentagens de motilidade progressiva e espermatozoides viáveis, e que, a BSP1 teve efeitos moduladores sobre a atividade funcional dos espermatozoides. Além disso, Thérien et al. (1995) reportaram que a motilidade dos espermatozoides bovinos diminuiu desde o 80 e 90% no começo do período de incubação (6-8 horas) para o 10-20% quando a BSP esteve presente (120 mg/mL). Similares resultados foram obtidos respeito à motilidade e viabilidade quando a BSP1 foi avaliada na ausência de heparina. No presente estudo foram encontradas taxas de clivagem e blastocistos tão altas para o meio de fertilização com heparina quanto para o meio de fertilização sem heparina com a adição de 10 µg/mL de BSP1, resultado que sugere que com o uso da proteína na mínima concentração os espermatozoides ejaculados conseguiram se capacitar, aumentando a sua viabilização para eles conseguirem fertilizar o oócito *in vitro* mais facilmente, encontrando assim discrepâncias com os estudos previamente mencionados. Propõe-se então que a BSP1 nas concentrações de 20 µg/mL e de 40 µg/mL no meio de fertilização sem heparina, embora proporcionem boas taxas de clivagem, podem ser contaminantes depois disso, devido a que as taxas de blastocistos são menores, como aconteceu com o uso de altas concentrações de norepinefrina na FIV em um estudo realizado por Way e Killian (2006).

Este evento pode ser devido a um longo tempo de exposição (18 horas) quando se incubaram células espermáticas e oócitos na presença da proteína BSP1 durante a fertilização *in vitro*; talvez provocando intoxicação dos espermatozoides, os oócitos e/ou os embriões. Essa hipótese foi gerada devido ao seguinte experimento, onde as diferentes concentrações da proteína BSP1 foram adicionadas no momento da seleção espermática por Percoll®, dado que o período de exposição foi bem mais curto (15 minutos) e as taxas de blastocistos quando usada uma concentração de 40 µg/mL foram comparáveis com o controle 1.

Estudos realizados por Parrish et al. (1989), indicaram que a presença de heparina no meio de incubação parece ser um pré-requisito quando os espermatozoides ejaculados bovinos são capacitados *in vitro*, reporte que em parte concorda com estes resultados pois o uso da heparina pareceu ser importante mas não indispensável para obter boas taxas de clivagem e blastocistos, sendo que com o uso da BSP1 em uma concentração de 10 µg/mL, podem-se obter resultados igualmente positivos, podendo a heparina ser substituída pela adição da proteína no meio de fertilização. Assim, tanto a heparina quanto a BSP1 são definitivamente importantes no processo de capacitação espermática. A heparina parece acelerar a capacitação, possivelmente devido à interação com as proteínas de ligação à heparina. Além disso, a heparina aumenta a síntese de AMPc, o pH intracelular e modula a fosforilação da proteína tirosina (Parrish et al., 1988; Visconti e Kopf, 1998). Já a BSP1 tem funções como a mediação da ligação do espermatozoide com o epitélio do oviduto, a habilidade para prolongar a sobrevivência e a mobilidade no oviduto (Gwathmey et al., 2003), evita a movimentação livre dos fosfolipídios, e estabiliza a membrana espermática (Manjunath et al., 2002), podendo assim promover a capacitação e ajudando no processo de fertilização (Srivastava, 2013). Portanto, ambas podem ser utilizadas no meio de fertilização, sendo que a proteína BSP1, em concentrações adequadas, pode substituir a heparina.

### 6.3 Adição de BSP1 no meio de seleção espermática (Percoll®)

Como explicado por (Guimaraes, 2014), a técnica de separação que precede um procedimento de FIV deve melhorar as características de qualidade espermática e remover o plasma seminal, espermatozoides mortos e outras células, incluindo leucócitos e bactérias (Henkel e Schill, 2003). Têm sido desenvolvidas muitas técnicas de separação de espermatozoides, e os gradientes descontínuos de Percoll® são aplicados rotineiramente para a preparação do sêmen bovino nos laboratórios de FIV devido á mais alta motilidade e ao número de doses inseminantes produzidas usando esta técnica (Cesari et al., 2006; Machado et al., 2009). Por este motivo, decidiu-se analisar as taxas de PIV de embriões quando adicionadas as diferentes concentrações de BSP1, esperando que os espermatozoides ejaculados tivessem maior contato com as proteínas, e tentando descobrir se é suficiente este período de 15 minutos da seleção dos espermatozoides por Percoll®, para que aconteça a ligação da BSP1 com as células espermáticas. Como esperado, a FIV em condições de controle 2, isto é, sem a presença de heparina nem de BSP1, não teve boas taxas de clivagem nem de blastocistos ( $64.2 \pm 1.8$  e  $22.2 \pm 1.9$ ) se comparadas com o controle 1 ( $78.9 \pm 1.7$  e  $44.1 \pm 4.3$  respectivamente). Porém, a adição da proteína BSP1 em todas as suas concentrações (10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) tiveram resultados similares quando comparadas com o controle 1, tanto para a taxa de clivagem ( $67.7 \pm 3.0$ ,  $68.7 \pm 3.5$  e  $75.2 \pm 3.8$ ) quanto para a taxa de blastocistos ( $21.9 \pm 2.9$ ,  $22.3 \pm 3.0$  e  $30.0 \pm 3.3$ ), sendo que de todos os tratamentos, quem teve melhores resultados foi a BSP1 em uma concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, a BSP1 na maior concentração teve esse melhor efeito quando comparado com as demais concentrações, devido a que provavelmente com uma maior quantidade de proteína no meio de Percoll®, teve mais possibilidades de contato com os espermatozoides, proporcionando assim o efluxo de colesterol para ficarem capacitados mais rapidamente e assim poderem fertilizar os oócitos no meio de fertilização. Sugere-se então que com uma alta concentração desta proteína, não acontece o mesmo efeito de inibição da capacitação, provavelmente por causa do tempo limitado da exposição dos espermatozoides com 40  $\mu\text{g/mL}$  de BSP1 no momento da centrifugação. Portanto, o

anterior explica e demonstra que a BSP1 promove a capacitação espermática do sêmen ejaculado sem a presença de heparina.

#### 6.4 Adição de BSP1 no meio de fertilização usando espermatozoides epididimários

Muitos experimentos sobre recuperação de espermatozoides epididimários têm sido realizados nos últimos anos com a ideia de que, como na cauda do epidídimo os espermatozoides estão armazenados, maduros e quase prontos para fertilizar o oócito, podem ser de grande ajuda como estratégia de criopreservação na qual serão obtidos bancos de germoplasma de animais de altas produções, animais em via de extinção, ou até em animais mortos de alto valor genético. Porém, até meu conhecimento nunca foi avaliado o efeito da adição de BSP1 exógena sobre as taxas de produção de embriões *in vitro* quando usados espermatozoides epididimários, tendo em conta que estas células só entram em contato com as BSPs a partir do momento que o animal ejacula, quando entram em contato com o plasma seminal. Neste experimento, quando comparado com as células espermáticas ejaculadas, os espermatozoides epididimários tiveram um comportamento diferente quando a heparina ou a BSP1 foram adicionadas ao meio de fertilização: Não foi observada nenhuma diferença entre as taxas de clivagem e de blastocistos nos dois grupos controle, isto é, com e sem heparina. Estes resultados concordam com Florman e First (1988) quando sugerem que a heparina por si mesma, não induz reação de acrossoma em espermatozoides epididimários sem antes serem expostos ao plasma seminal. Além disso, alguns estudos encontraram que quando espermatozoides epididimários são previamente incubado com as proteínas BSPs, podem potencializar a capacitação induzida por heparina (Thérien et al., 1995) devido a que aumentam os sítios de união para a heparina na superfície espermática (Moreau et al., 1998). Provavelmente foi por esta razão que neste estudo foram encontrados melhores resultados enquanto às taxas de clivagem e blastocistos (74.1 e 40.8%) quando foi adicionada a heparina no meio de fertilização com o sêmen ejaculado, que como sabemos, devido a seu contato com o plasma seminal, já tem proteínas BSPs ligadas à

superfície espermática; do que com a adição de heparina dentro do meio de fertilização quando foram usados espermatozoides epididimários (68.5 e 24.7%).

Neste experimento aconteceram quatro fatos importantes que nos leva a uma sugestão imediata: o fato de ter encontrado melhores taxas de clivagem quando foram usadas as concentrações de 10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BSP1 e comparadas com os resultados do grupo controle 2; que houvessem maiores taxas de clivagem quando usada a concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  comparada com o controle 1; que o controle 2 tenha gerado melhores resultados para a taxa de blastocistos que o controle 1; e que as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BSP1 tiveram maiores taxas de blastocistos quando comparadas com o controle 2, sugerem que a BSP1 exógena pôde desencadear eventos relacionados com a capacitação dos espermatozoides epididimários, a qual permitiu a reação de acrossoma e uma fertilização normal (Gadella e Luna, 2014; Parrish, 2014). Dado que este sistema de fertilização *in vitro* não incluiu a adição de heparina na presença da BSP1 exógena, é possível sugerir que a BSP1 induziu a capacitação dos espermatozoides epididimários e/ou acontecessem eventos associados com uma reação de acrossoma provocada pelos COC's. Isto está em desacordo com Thérien et al. (1995), quem concluíram que as BSPs por si sós, não induzem reação de acrossoma de espermatozoides epididimários na ausência de heparina. Portanto, são precisos mais estudos para tentar entender o mecanismo da BSP1 na presença e ausência de heparina e seu possível efeito capacitante durante a fertilização.

Finalmente foi encontrado que a incubação dos espermatozoides epididimários com a BSP1 no meio Fert-TALP não teve nenhum efeito deletério sobre o desenvolvimento embrionário, em nenhuma das concentrações de BSP1 usadas nesta pesquisa. Embora não tenha certeza do mecanismo ou razão pela qual isto pôde ter acontecido, sugere-se que talvez os espermatozoides epididimários não tinham nenhuma BSP ligada à membrana espermática antes do tratamento no meio de fertilização. Desse modo, uma alta quantidade de BSP1 foi ligada ao espermatozoide durante o tempo de fertilização, deixando pouca quantidade de BSP1 livre, que pudesse ocasionar prejuízos sobre os oócitos e/ou sobre os mesmos embriões.

## 7 CONCLUSÕES

A BSP1 exógena adicionada a espermatozoides ejaculados durante um período de 6 horas induziu a reação de acrossoma, mas não em taxas comparáveis como quando as células foram incubadas com a presença de heparina.

A BSP1 exógena adicionada ao meio Fert-TALP induziu a produção *in vitro* de embriões bovinos. Quando usado sêmen ejaculado os efeitos da baixa concentração de BSP1 sobre a clivagem e o crescimento de blastocistos foram similares àquelas obtidas somente com heparina, permitindo a capacitação espermática e a reação de acrossoma *in vitro*. Porém, a maior concentração de BSP1 esteve associada com o crescimento de blastocistos reduzido. Com espermatozoides epididimários, o desenvolvimento de blastocistos com e sem heparina foi mínimo, enquanto que com maiores concentrações de BSP1 permitiram melhores taxas de blastocistos. Em contraste com o que foi detectado com o sêmen ejaculado, a BSP1 não teve um efeito deletério sobre a FIV quando os oócitos foram fertilizados com espermatozoides epididimários.

É claro portanto que, tanto os espermatozoides epididimários quanto os ejaculados têm diferentes respostas com a heparina e com a BSP1 (dentro do meio de fertilização e com a incubação no Percoll®), dadas as condições *in vitro* estabelecidas em este estudo, isto é, pela diferença do tempo de exposição com os espermatozoides/COCs.



## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em este experimento foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de BSP1 com o uso de sêmen ejaculado e epididimário, congelado-descongelado. Porém, ainda deve ser realizado o experimento da adição de BSP1 na seleção por Percoll® de espermatozoides epididimários.

As vias fisiológicas e os mecanismos moleculares associados com tais respostas, devem ser investigadas posteriormente.

## 9 REFERÊNCIAS

AÏDA ABOU-HAILA, A., DAULAT, R.P. TULSIANI. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v 485, p 72–81, 2009.

ARANGASAMY, A., SINGH, L.P., AHMED, N., ANSARI, M.R., RAM, G.C. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding a buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v 90, p 243 – 54, 2005.

BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**. v 71, p 461 – 470, 2005.

BERTOL, M.A.F, WEISS, R.R., THOMAZ-SOCCOL, V., KOZICKI, L.E., FUJITA, A.S., DE ABREU, R.A., GREEN, K.T. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. **Brazilian archives of Biology and technology**. v 56, n 5, p 777 - 783, 2013.

BLASH, S., MELICAN, D., GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**. v 54, p 899 – 905, 2000.

BOISVERT, M., BERGERON, A., LAZURE, C., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**. v 70, p 656 – 661, 2004.

CALVETE, J.J., RAIDA, M., GENTZEL, M., URBANKE, C., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and gelatin-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**. v 407, p 201 - 206, 1997.

CALVETE, J.J., MANN, K., SCHAFFER, W., SANZ, L., REINERT, M., NESSAU, S., RAIDA, M., TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**. v 310, p 616 - 622, 1995.

CARY, J.A., KELLY FARNSWORTH, S.M, HAYNA, J.T., DUOOS, L., FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **Can Vet J.** v 45, p 35–41, 2004.

CESARI, A., KAISER, G.G., MUCCI, N. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production in vitro. **Theriogenology.** v 66, p 1185 – 93, 2006.

CHAMBERLAND, A., FOURNIER, V., TARDFF, S., SIRARD, M.A., SULHVAN, R., BADEY, J.L. The effect of heparin on motility parameters and protein Phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology.** v 55, p 823 - 835, 2001.

CHANDONNET, L., ROBERTS, K.D., CHAPDELAINE, A., MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development.** v 26, p 313 - 318, 1990.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature.** v 168, p 697 - 698, 1951.

D'AMOURS, O., BORDELELEAU, L.J, FRENETTE, G., BLONDIN, P., LECLERC, P., SULLIVAN, R. Binder of sperm 1 and epididymal sperm binding protein 1 are associated with different bull sperm subpopulations. **Reproduction.** v 143, p 759 – 771, 2012.

D'AMOURS, O., FRENETTE, G., FORTIER, M., LECLERC, P., SULLIVAN, R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction.** v 139, p 545 - 556, 2010.

DASGUPTA, S., MILLS, C.L., FRASER, L.R. Ca(2p)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. **Journal of Reproduction and Fertility.** v 99, p 135 – 143, 1993.

, M.F. VINCENTI, L.M, MARTINI, A.N., PONCE, A.A., RUIZ, R.D. Effects of PDC-109 on bovine sperm functional activity in presence or absence of heparin. **Theriogenology.** v 62, n 1 – 2, p 207–216, 2004.

DEL CAMPO, M.R., DEL CAMPO, C.H., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J. The application of new reproductive technologies to South American camelids. **Theriogenology.** v 43, p 13 – 20, 1995.

DESNOYERS, L., MANJUNATH, P., Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**. v 267, p 10149 – 10155, 1992.

DROBNIS, E.Z., ZHONG, C.Q, OVERSTREET, J.W. Separation of cryopreserved human semen using sephadex columns, washing, or percoll gradients. **Journal of Andrology**. v 12, p 201- 208, 1991.

ESCH, F., BÖHLEN, P., LING, N., BRAZEAU, P., GUILLEMIN, R. Isolation and characterization of the bovine hypothalamic growth hormone releasing factor.. , p 772 – 779, 1983.

ESTEVEZ, S.C., SHARMA, R.K., THOMAS JR, A.J, AGARWAL, A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo–osmotic swelling test. **Int. braz j urol**. v 33, n 3, 2007.

FAN, J., LEFEBVRE, J., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. **Gene**. v 375, p 63 – 74, 2006.

FLORMAN, H.M., FIRST, N.L. The regulation of acrosomal exocytosis: I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. **Developmental Biology**. v 128, p 453 – 63, 1988.

GADELLA, B.M., LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**. v 81, p 74 – 84, 2014.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**. v 107, n 3 - 4, p 229 – 236, 2008.

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

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**. v 59, p 599 - 616, 2003.

GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide e a integridade de membrana do espermatozoide bovino. **Tese (Doutorado)**—Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, p 92, 2004.

GRAHAM, E.F., GRAHAM, J.K. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and the fertility of bovine semen. **Journal of Dairy Science**. v 73, p 91 – 97, 1990.

GWATHMEY, T.M., IGNOTZ, G.G., SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**. v 69, p 809 – 815, 2003.

HARRISON, R.A., GADELLA, B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**. v 63, n 3, p 42 – 51, 2005.

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

HUNG, P., SUAREZ, S.S. Alterations to the Bull Sperm Surface Proteins That Bind Sperm to Oviductal Epithelium. **Biology of Reproduction**. v 87, p 1 - 11, 2012.

KANE, M.T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**. v 79, p 171 – 190, 2003.

JAISWAL, B.S., EISENBACH, M. Capacitation. **Fertilization**. Capítulo 3, p 57–117, 2002.

JONES R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A hypothesis. **Biol Reprod**. v 71, n 5, p 1405 – 1411, 2004.

KANEKO, S., MORIKAWI, C., SATO, H. Development of multiple exposure photography method for analysis of sperm motility and preparation of washed sperm with ficoll density gradient. **Jpn J Fertil Steril**. v 25, p 491 – 493, 1980.

KATAYAMA, K.P., STEHMK, E., JEYENDRAN, R.S. In vitro fertilization outcome: glass wool-filtered sperm vs swim-up sperm. **Fertility and Sterility**. v 52, p 670 – 672, 1989.

KATO, Y., NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. **Theriogenology**. v 72, n 5, p 624 – 35, 2009.

KOZDROWSKI, R., NIŻAŃSKI, W., DUBIEL, A., OLECH, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v 9, n 31, p 2-6, 2011.

KRUIP, A.M., DIELEMAN, S.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. **Reproduction Nutrition Development**. v 22, p 465 – 473, 1982.

LAFLEUR, M., COURTEMANCHE, L., KARLSSON, G., EDWARDS, K., SCHWARTZ, J.L., MANJUNATH, P. Bovine binder-of-sperm protein BSP1 promotes protrusion and nanotube formation from liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v 399, p 406 – 411, 2011.

LEBLOND, E., DESNOYERS, L., MANJUNATH, P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**. v 34, p 443 - 449, 1993.

LEFEBVRE, J., FAN, J., CHEVALIER, S., SULLIVAN, R., CARMONA, E., MANJUNATH, P. Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. **Molecular Human Reproduction**. v 13, p 45 – 53, 2007.

LONERGAN, P., FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**. v 69, p 17 – 22, 2008.

MACHATY, Z. PEIPPO, J., PETER, A. Review - Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. **Theriogenology**. v 78, p 937 – 950, 2012.

MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation **Journal of Reproductive Immunology**. v 53, n 1 - 2, p 109 - 19, 2002.

MANJUNATH, P, SAIRAM, M.R., UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reproduction**. v 7, n 3, p 231-238, 1987.

MARTINEZ-PASTOR, F., GARCIA-MACIAS, V., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C., HERRAEZ, P., DE PAZ, P., ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**. v 65, p 471 - 485, 2006.

MARTINS, C.F., DRIESSEN, K., MELO COSTA, P., CARVALHO-NETO, J.O., DE SOUSA, R.V., RUMPF, R., DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymis stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**. v 116, p 50–57, 2009.

MARTINS, C.F., RUMPF, R., PEREIRA, D.C., DODE, M.N. Short communication: Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**. v 101, p 326 – 331, 2007.

MARTINS, J.A.M., SOUZA, C.E.A., GONZALEZ, V.C., RÊGO, J.P.A., MENEZES, E.B., VASCONCELOS, I.M., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., MOREIRA, R.A., MORENO, F.B., RAMOS, A.F., MOURA, A.A. Isolation and partial characterization of Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) from three bovine subspecies raised in Brazil. Resumo apresentado no **IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR)**, 2012.

MCKINNON, A.O., CARNEVALE, E.M., SQUIRES, E.L., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Heterogeneous and xenogenous fertilization of equine oocytes. Proc 10th Equine Nutrition and Physiology Symposium, San Antonio, TX. **Society for Theriogenology**, Hastings, NE; p 197 – 201, 1992.

MILTENYI, S., MULLER, W, WEICHEL, W, RADBRUCH, A. High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS1. **Cytometry**. v 11, p 231 - 238, 1990.

MOROTTI, F., SANCHES, B.V., PONTES, J.H.F., BASSO, A.C., SIQUEIRA, E.R., LISBOA, L.A., SENEDA, M.M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**. v 81, p 696 - 701, 2014.

- MOURA, A.A., SOUZA, C.E.A., STANLEY, B.A., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**. v 73, n 10, p 2006 – 2020, 2010.
- MOURA, A.A., KOC, H., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland FLUID of mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**. v 98, p 169 - 188, 2009.
- MOURA, A.A., CHAPMAN, D., KOC, H., KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**. v 98, p 169 – 188, 2007.
- NAUC, V., MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**. v 63, n 4, p 1058 - 66, 2000.
- PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**. V 81, p 67 – 73, 2014.
- PARRISH, J.J., KROGENAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**. v 44, p 859 – 69, 1995.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**. v 38, p 1171 – 1180, 1988.
- PLANTE, G., THÉRIEN, LACHANCE, I.C., LECLERC, P., FAN, J., MANJUNATH, P. Implication of the human Binder of Sperm Homolog 1 (BSPH1) protein in capacitation. **Molecular Human Reproduction**. v 20, n 5, p 409 - 421, 2014.
- PLANTE, G., THÉRIEN, I., MANJUNATH, P. Characterization of Recombinant Murine Binder of Sperm Protein Homolog 1 and its Role in Capacitation. **Biology of Reproduction**. v 87, n 20, p 1 – 11, 2012.
- PRAKASH, P., LEYKIN, L., CHEN, Z. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). **Fertility and Sterility**. v 69, p 722 – 6, 1998.
- RAMAKRISHNAN, M., ANBAZHAGAN, V., PRATAP, T.V., MARSH, D., SWAMY, M.J. Membrane Insertion and Lipid-Protein Interactions of Bovine Seminal Plasma Protein



PDC-109 Investigated by Spin-Label Electron Spin Resonance Spectroscopy. **Biophysical Journal**. v 81, n 4, p 2215 - 2225, 2001.

ROBERTSON, I., NELSON, R.E. Certification and identification of the embryo. *In* STRIGFELLOW, SEIDEL, S.M. (ed.), **Manual of International Embryo Transfer**. **International Embryo Transfer Society**. p. 103-117, 2011.

SOUZA, C.E.A, MOURA, A.A., MONACO, E., KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**. v 105, p 72 – 89, 2008.

SOUZA-FABJAN, J.M.G, PANNEAU, B., DUFFARD, N., LOCATELLI, Y., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F., MERMILLOD, P. Review - In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**. v 81, p 1149 – 1162, 2014.

SUZUKI, F., YANAGIMACHI, R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. **Gamete Research**. v 23, p 335 – 347, 1989.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., STERCKX, V., MAES, D., DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**. v 37, p 127 – 32, 2002.

TANNERT, A., KURZ, A., ERLEMANN, KARL-RUDOLF, MULLER, K., HERRMANN, A., SCHILLER, J., TOPFER-PETERSEN, E., MANJUNATH, P., MULLER, P. The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine containing lipids from the outer membrane leaf let. **European Biophysics Journal**. v 36, n 4 – 5, p 61-75, 2007.

THÉRIEN, I., BERGERON, A., BOUSQUET, D., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproduction and Development**. v 71, p 97 – 106, 2005.

THÉRIEN, I., BOUSQUET, D. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**. v 65, n 1, p 41 – 51, 2001.

THÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**. v 61, p 590 - 598, 1999.

THÉRIEN, I., SOUBEYRAND, S., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**. v 57, p 1080 – 1088, 1997.

THÉRIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of reproduction**. v 52, p 1372 – 1379, 1995.

THERRIEN, A., MANJUNATH, P., LAFLEUR, M. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. **Biochimica et Biophysica Acta**. v 1828, p 543 – 551, 2013.

THERRIEN, A., MANJUNATH, P., LAFLEUR, M. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. **Biochimica et Biophysica Acta**. v 1828, p 543 - 551, 2013.

VAN TILBURG, M.F., RODRIGUES, M.A.M., MOREIRA, R.A., MORENO, F.B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O., CÂNDIDO, M.J.D., MOURA, A.A. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**. v 79, p 1247 – 1261, 2013.

VILLEMURE, M., LAZURE, C, MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v 1, p 39-49, 2003.

VISCONTI, P.E., WESTBROOK, V.A, CHERTIHIN, O., DEMARCO, I., SLEIGHT, S., DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**. v 53, p 133 – 150, 2002.

VISCONTI, P.E., BAILEY, J.L., MOORE, G.D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**. v 121, p 1129 – 1137, 1995.

VISCONTI, P.E., MOORE, G.D., BAILEY, J.L., LECLERC, P., CONNORS, S.A, PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP dependent pathway. **Development**. v 121, p 1139 – 1150, 1995.

WAH, D.A, FERNANDEZ-TORNERO, C., SANZ, L., ROMERO, A., CALVETE, J.J. Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. **Structure**. v 10, p 505 – 514, 2002.

ZENG, Y., CLARK, E.N., FLORMAN, H.M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. **Developmental Biology**. v 171, p 554 – 563, 1995.