

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INFLUÊNCIA DA KISSPEPTINA NA ETAPA DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA
A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÓES BOVINOS**

Mayara Mafra Soares
Médica veterinária

Uberlândia – MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INFLUÊNCIA DA KISSPEPTINA NA ETAPA DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA
A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Mayara Mafra Soares

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia
- UFU, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias
(Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo

Co-Orientadora: Dra. Kele Amaral Alves

Uberlândia – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S676i
2018

Soares, Mayara Mafra, 1990
Influência da kisspeptina na etapa de seleção espermática para a
produção in vitro de embriões bovinos / Mayara Mafra Soares. - 2018.
72 f. : il.

Orientador: Gustavo Guerino Macedo.
Coorientadora: Kele Amaral Alves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.103>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Reprodução animal - Teses. 3. Bovino -
Espermatozoides - Teses. 4. Blastocisto - Teses. I. Macedo, Gustavo
Guerino. II. Alves, Kele Amaral. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

MAYARA MAFRA SOARES

**INFLUÊNCIA DA KISSPEPTINA DURANTE A ETAPA DE SELEÇÃO
ESPERMÁTICA PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo

Co-Orientadora: Dra. Kele Amaral Alves

Uberlândia, 26 de janeiro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo

(Orientador-FAMEV/UFU)

Profa. Dra. Teresinha Inês de Assumpção

(Examinadora-FAMEV/UFU)

Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

(Examinadora-FCAV/UNESP)

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e amor incondicional,
estando sempre ao meu lado em todos os momentos da minha
vida, nas vitórias e derrotas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter iluminado meus caminhos, me acalmando e fortalecendo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Mafra e Joaquim, pelo amor, educação e incentivo constante para que eu me esforçasse a realizar tudo que me propusesse a fazer, me dedicando cada vez mais para realizar meus sonhos. Meus irmãos Pollyanna e Robson, pela ajuda, apoio, brincadeiras e fonte de inspiração por serem excelentes profissionais. Minha cunhada Natássia e minhas sobrinhas Pietra e Anne, pelo amor e felicidade constante que trazem para a minha vida, tornando meus dias mais leves. Meu cunhado Fernando pela prontidão em ajudar e por ser a “injuera” que é. Meu namorado Pio por todo amor, amizade e companheirismo me auxiliando quase todo final de semana no laboratório. Meus sogros Rosuíta e Betão e cunhado Luiz, por serem a minha segunda família e sempre me incentivarem em busca do meu sucesso. Se hoje cheguei onde estou foi por influência de todos vocês. Amo vocês!

A toda minha família pela torcida e orações que com certeza me deram forças pra chegar até aqui.

As minhas grandes amigas Carla e Maysa que sempre me incentivaram e auxiliaram na tentativa de realizar os meus sonhos, vibrando com as minhas conquistas e me levantando a cada “tombo” que eu tomava.

A todos os meus amigos por me proporcionarem momentos inesquecíveis, tornando os meus dias mais descontraídos e felizes. Em particular aos amigos da Setentesão (70ª turma de Medicina Veterinária), que me auxiliam sempre nos desafios da nossa profissão.

Aos graduandos, técnicos, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia e laboratórios parceiros, por toda ajuda e ensinamentos indispensáveis para que pudesse realizar minha pesquisa. Em especial aos amigos que fiz nesses 2 anos de mestrado: “Tia” Deize, Paula “Maria”, Graci, Bia, Jairo e Mayara, que sempre me socorreram e aturaram o meu mal humor e pessimismo quando algo dava errado.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo, pela confiança, ensinamentos e exigências, me fazendo perceber que sou capaz de realizar atividades, as quais achava não ser capaz. Minha co-orientadora Dra. Kele, por toda ajuda, me passando um pouco do seu conhecimento, pela paciência e conselhos.

Aos professores da Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Dra. Ricarda Maria dos Santos, Dra. Teresinha Assumpção e Dr. José Octávio Jacomini, pelos conhecimentos, carinho e atenção.

Aos Médicos Veterinários e funcionários do Frigorífico Real pela disponibilidade e auxílio nas coletas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para custear a execução do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Experimento - influência da kisspeptina na etapa de seleção espermática para a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	33
Figura 2: Representação esquemática dos padrões de coloração produzida pela associação das sondas fluorescentes – IP, JC-1 e FITC-PSA (Adaptado de CARREIRA, 2008).....	37
Figura 3: Médias das taxas de motilidade e escore de vigor dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e antagonista P-234 nos momentos pré e pós seleção espermática.....	39
Figura 4: Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes IP, FTIC-PSA e JC-1 (aumento 40x).....	45

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Taxa de clivagem e blastocisto dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e antagonista P-234.....	40
Tabela 2: Proporção de espermatozoides com alto potencial mitocondrial em função dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e antagonista P-234, no momento pré e pós seleção espermática.....	41
Tabela 3: Proporção de espermatozoides com integridade de membrana plasmática em função dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e antagonista P-234, no momento pré e pós seleção espermática.....	42
Tabela 4: Proporção de espermatozoides com integridade de acrosssoma em função dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e antagonista P-234, no momento pré e pós seleção espermática.....	43
Tabela 5: Análise de correlação entre os fatores alto potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e integridade de acrosssoma no momento pós seleção espermática.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	O ESPERMATOZOIDE	12
2.2	ESPERMATOGÊNESE	13
2.3	MATURAÇÃO ESPERMÁTICA	14
2.4	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA	15
2.5	ENDOCRINOLOGIA DA ESPERMATOGÊNESE	17
2.5.1	<i>Células de Sertoli</i>	17
2.5.2	<i>Células de Leydig</i>	18
2.6	KISSPEPTINA	18
2.6.1	<i>Ação no trato reprodutivo</i>	19
2.7	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE)	22
2.7.1	<i>Maturação in vitro (MIV)</i>	22
2.7.2	<i>Fecundação in vitro (FIV)</i>	24
2.7.2.1	<i>Capacitação espermática</i>	24
2.7.3	<i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	25
2.8	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	26
2.8.1	<i>Avaliação de Membrana Plasmática</i>	27
2.8.2	<i>Avaliação de Acrossoma</i>	27
2.8.3	<i>Avaliação do Potencial Mitocondrial</i>	28
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVO GERAL	30
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	HIPÓTESES	31
6	MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1	REAGENTES	32
6.2	COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS	32
6.3	LOCAL E ANIMAIS	32
6.4	DESENHO EXPERIMENTAL	33

6.5	OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS COMPLEXOS <i>CUMULUS-OVÓCITOS</i> (COCS) ..	33
6.6	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	34
6.7	ANÁLISES DAS TAXAS DE PRODUÇÃO	35
6.8	ANÁLISE MOTILIDADE E VIGOR.....	35
6.9	AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL MITOCONDRIAL	36
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
7	RESULTADOS	39
8	DISCUSSÃO	46
9	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

INFLUÊNCIA DA KISSPEPTINA NA ETAPA DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÓES BOVINOS

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a adição da Kisspeptina (Kp) no processo *in vitro* de seleção espermática, quanto à viabilidade dos espermatozoides bovinos e taxas de produção embrionária. Para isso foram utilizados 980 ovócitos provenientes de ovários de abatedouro-frigorífico e 75 palhetas de sêmen comercial bovino. Os tratamentos foram realizados nos espermatozoides durante a etapa de seleção espermática *in vitro* pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de Percoll® 90% e 45% de acordo com os seguintes tratamentos: Controle (n = 182), Kp 10^{-5} M (n = 198), Kp 10^{-6} M (n = 200), Kp 10^{-7} M (n = 206) e antagonista P-234 50 μ M (n = 194), com as diluições realizadas nos dois gradientes respeitando-se as devidas concentrações. Os espermatozoides foram analisados no momento pré e pós seleção espermática para motilidade e vigor, e submetidos à coloração pelas sondas JC-1, IP e FITC-PSA, para avaliar o potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e integridade do acrossoma em microscópio de varredura a laser confocal LSM 510 meta. Posterior aos tratamentos, os espermatozoides foram utilizados normalmente nos procedimentos de PIVE. No D2 e D7 foram realizadas análises de produção, baseadas nas taxas de clivagem e blastocistos, respectivamente. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade pelo *guided analysis* do SAS, posteriormente utilizado o proc GLIMMIX para avaliação do modelo experimental e posteriormente ao teste de Tukey-Kramer para comparação de médias. Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$. Os resultados de motilidade e vigor e taxas de produção embrionária foram semelhantes ($P > 0,05$) entre todos os tratamentos propostos. A taxa de clivagem (n=846) foi maior que 82% e a porcentagem de produção de blastocistos (n=331) foi maior que 29%. Quanto ao potencial mitocondrial, os grupos Kp 10^{-6} e Kp 10^{-7} (92,6%) foram superiores ($P < 0,05$) aos grupos Controle (89,8%) e P-234 (83,8%), sendo este último inferior ($P < 0,05$) a todos os outros tratamentos. Na avaliação da integridade de membrana plasmática e integridade do acrossoma (IMP/IA), os tratamentos com adição de Kp foram semelhantes ($P > 0,05$) entre si Kp 10^{-5} (88,9%/90,9%), Kp 10^{-6} (90,7%/91,8%) e Kp 10^{-7} (90,2%/91,4%) e ao antagonista P-234 (90,5%/90,8%), respectivamente. Apenas o tratamento Kp 10^{-6} apresentou resultado superior ($P < 0,05$) ao grupo Controle (87,9%/89,1%). Ao correlacionar as variáveis analisadas pela microscopia confocal, foi observada uma correlação significativa e positiva entre alto potencial mitocondrial e integridade de membrana plasmática ($r = 0,80$; $P < 0,0001$),

integridade de acrossoma e alto potencial mitocondrial ($r = 0,80$; $P < 0,0001$), integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma ($r = 0,84$; $P < 0,0001$). Finalmente, pode-se concluir que a concentração equilibrada da Kp proporcionou maior viabilidade aos espermatozoides bovinos referente ao potencial mitocondrial, integridade acrossômica e de membrana plasmática. Já o antagonista P-234 apresentou efeito prejudicial referente ao potencial mitocondrial.

Palavras-chave: Espermatozoide, Blastocistos, Antagonista P-234, KISS1 e KISS1R.

INFLUENCE OF KISSPEPTIN IN THE SPERMATIC SELECTION STAGE FOR *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the addition of Kisspeptin (Kp) in the *in vitro* process of spermatic selection, regarding the viability of bovine spermatozoa and embryo production rates. For this, 980 oocytes were obtained from slaughterhouse ovaries and 75 commercial bovine semen straws were used. The treatments were performed on the spermatozoa during the *in vitro* spermatic selection stage by the centrifugation method with 90% and 45% Percoll® discontinuous gradients according to each proposed treatment: Control (n = 182), Kp 10-5 M (n = 198), Kp 10-6 M (n = 200), Kp 10-7 M (n = 206) and 50 μ M P-234 antagonist (n = 194), with the dilutions carried out on both gradients respected concentrations. The spermatozoa were analyzed before and after spermatic selection for motility and vigor, and were submitted to staining with fluorescent probes JC-1, IP and FITC-PSA, to evaluate the mitochondrial potential, plasma membrane integrity and acrosome integrity under confocal laser scanning microscope LSM 510 meta. After the treatments, spermatozoa were normally used in IVEP procedures. The production analyzes were performed on D2 and D7, based respectively on cleavage and blastocysts rates. The data were submitted to the normality and homogeneity test by guided analysis SAS, after were used the proc GLIMMIX procedure to evaluate the experimental model and later the Tukey-Kramer test for comparison of means. Differences are considered when P < 0.05. The results of motility, vigor and production rates were similar (P > 0.05) among all proposed treatments. The cleavage rate (n = 846) was higher than 82% and the percentage of blastocyst production (n = 331) higher than 29% in all treatments. The mitochondrial potential of Kp 10⁻⁶ and Kp 10⁻⁷ (92.6%) groups was higher (P < 0.05) to the Control (89.8%) and P-234 (83.8%) groups, the latter being lower (P < 0.05) than all other treatments. Plasma membrane integrity and acrosome integrity (PMI/AI) evaluations showed that treatments with Kp addition were similar, (P > 0.05) Kp 10⁻⁵ (88.9%/90.9%), Kp 10⁻⁶ (90.7%/91.8%) and Kp 10⁻⁷ (90.2%/91.4%) and the P-234 antagonist (90.5%/90.8%), respectively. The Kp 10⁻⁶ treatment presented a superior result (P < 0.05) to the Control group (87.9%/89.1%). When correlating the variables analyzed by confocal microscopy, a significant and positive correlation was observed between high mitochondrial potential and plasma membrane integrity ($r = 0.80$; P < 0.0001), acrosome integrity and high mitochondrial potential ($r = 0.80$, P < 0.0001), plasma membrane integrity and acrosome integrity ($r = 0.84$, P < 0.0001). Finally, it can be concluded

that the balanced concentration of Kp provided greater viability to bovine spermatozoa related to mitochondrial potential, acrosome integrity and plasma membrane. The P-234 antagonist presented a detrimental effect on the mitochondrial potential.

Key-words: Spermatozoa, Blastocysts, P-234 antagonist, KISS1 and KISS1R.

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias ligadas à reprodução animal são utilizadas como ferramentas para maximizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos principalmente bovinos, resultando em maior número de descendentes. Além disso, indiretamente aumenta-se o mérito genético do rebanho, uma vez que estas técnicas proporcionam a disseminação massiva do material superior, elevando-se assim o progresso genético por tempo (DE LIMA; STERZA, 2016) e a lucratividade para o produtor rural. Uma biotécnica importante para explorar esse potencial genético é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual viabiliza a diminuição do intervalo entre gerações, além de permitir a introdução/intensificação do material genético de machos e fêmeas identificadas como geneticamente superiores (BRACKETT; ZUELKE, 1993; SANTL et al., 1998; BUENO; BELTRAN, 2008; MELLO et al., 2016).

Apesar dos avanços, a PIVE ainda apresenta desempenho aquém do ideal no que se refere à produção de embriões, com uma taxa de 40% dos ovócitos atingindo o estágio de blastocistos (LONERGAN; FAIR, 2008) para laboratórios comerciais e 30% em ambiente de pesquisa (MAPLETOFT, 2013). Assim, o desenvolvimento de estudos para encontrar novas alternativas e produtos para aumentar as taxas de produção na PIVE e melhorar a qualidade dos blastocistos é de grande relevância científica.

Neste contexto, a descoberta da ação da Kisspeptina (Kp) no controle da fertilidade, por atuar em diferentes níveis desde núcleos hipotalâmicos (REDMOND et al., 2011) a gametas (PINTO et al., 2012; SAADEL DIN et al., 2012; HSU et al., 2014), incentivou o desenvolvimento de produtos, processos e meios que mimetizem cada vez mais os aspectos fisiológicos da produção *in vivo* (SILVA et al., 2009; GUEMRA et al., 2013), na tentativa de aumentar a produção *in vitro* e a qualidade dos embriões bovinos.

A Kp, conhecida também pela sua ação anti-metastática em células cancerígenas malignas, é um peptídeo produto do gene KISS1 com afinidade pelo receptor KISS1R, acoplado a uma proteína G transmembrana (HIDEN et al., 2007; PINILLA et al., 2012). Este peptídeo atua principalmente no hipotálamo estimulando neurônios de GnRH, promovendo a liberação de LH e FSH (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2007; EZZAT et al., 2010). A expressão do gene codificador desse peptídeo e seu receptor já foi constatada em tecidos reprodutivos de fêmeas (CASTELLANO et al., 2006; GAYTÁN et al., 2009) e machos (OHTAKI et al., 2001; TERAO et al., 2004; ZHAO et al., 2010). Mais recentemente, esse peptídeo e seu receptor também foram detectados em espermatozoides

humanos (PINTO et al., 2012) e KISS1R em espermatozoides de camundongos (HSU et al., 2014), sugerindo um papel regulatório nas gônadas e gametas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O ESPERMATOZOIDE

Os espermatozoides são células haplóides, alongadas, constituídas de cabeça, cauda, colo que une as duas estruturas (FLESCH; GADELLA, 2000) e membrana plasmática, acrossomal interna e externa e nuclear (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Todas as características estruturais do espermatozoide estão direcionadas para a mesma finalidade, realizar a junção da zona pelúcida (ZP) e membrana plasmática para que o material genético do espermatozoide consiga se unir com o material genético do ovócito, resultando na fertilização e zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994).

A cabeça do espermatozoide possui um formato arredondado e achatado, composta pelo núcleo, acrossoma e pequenas quantidades de estruturas do citoesqueleto e citoplasma (EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESCH; GADELLA, 2000). O acrossoma está localizado na extremidade anterior da cabeça, entre a membrana acrossomal interna e a membrana nuclear, sendo estas formadas por glicoproteínas e açucares. É uma vesícula secretora modificada, originária do complexo de Golgi na espermátide, que contém enzimas hidrolíticas que auxiliam no processo de fecundação, como hialuronidase e acrosina. Estas por sua vez, são liberadas após a ligação do espermatozoide com a ZP do ovócito, em um processo denominado reação acrossomal, no qual ocorre a fusão da membrana acrossomal externa e membrana plasmática, formando poros, liberando as enzimas (FLESCH; GADELLA, 2000; GILBERT, 2003), que realizam uma digestão da ZP, permitindo a entrada do material genético do espermatozoide no ovócito (BARTH; OKO, 1989; GILBERT, 2003; KNOBIL; NEILL, 2006).

A cauda do espermatozoide é composta pelo colo, peça intermediária, principal e terminal. Na região pós-acrossomal encontra-se o colo, estrutura que conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda ou flagelo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A cauda é constituída por um axonema central, estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática, composta por nove microtúbulos duplos dispostos radialmente ao redor de dois microtúbulos simples centrais (MORTIMER, 2000). O batimento axonemal ocorre pelo deslizamento dos microtúbulos (COSSON, 1996; MORTIMER, 1997). Na peça intermediária, o axonema é circundado por um arranjo helicoidal de mitocôndrias, as quais disponibilizam energia para o batimento flagelar através da produção de ATP (MORTIMER, 1997).

As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) são formadas por lipídios, proteínas, glicoproteínas, colesterol e glicolipídios, construídas durante a espermatogênese. Atuam como barreira seletiva entre componentes presentes no meio intra e extracelular sofrendo modificações durante o trânsito e armazenamento no epidídio e trato reprodutivo feminino (OURA; TOSHIMORI, 1990; HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCH; GADELLA, 2000; GWATHMEY et al., 2006). Cada região da membrana plasmática tem domínios e funções específicas: a região que recobre a cabeça do espermatozoide tem como função a reação acrossomal e a fusão com o ovócito; a que recobre a peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias está envolvida na produção de energia e a que recobre o flagelo, envolvido na motilidade (FLESCH; GADELLA, 2000). As proteínas presentes na membrana plasmática realizam o transporte específico de moléculas, podendo ser influenciado pela fluidez e permeabilidade da membrana. A fluidez está diretamente relacionada aos tipos de lipídios que formam a membrana plasmática (ALBERTS et al., 1994); proporção colesterol:lipídeos, sendo que quanto mais colesterol, menos flexível, fluída e permeável será a membrana; níveis de saturação de ácidos graxos e fosfolipídios presentes na membrana (WOLFE et al., 1998); e temperatura a qual está exposta (ALBERTS et al., 1994; FLESH; GADELLA, 2000). Isso demonstra que a membrana plasmática não é estática, seus componentes se distribuem aleatoriamente e se movimentam livremente, caracterizando a fluidez da membrana, que se encontra em estado líquido-cristalino (AMANN; GRAHAM, 1992; ALBERTS et al., 1994; GIRAUD et al., 2000).

2.2 ESPERMATOGÊNESE

É o processo no qual as células germinativas diplóides passam por uma série de divisões celulares no epitélio dos túbulos seminíferos, transformando-se em espermátides haplóides (KUDRYAVTSEV et al., 2003), ou seja, é a soma dos eventos que ocorrem nos testículos, resultando na produção de espermatozoides (JOHNSON et al., 2000). As fases de desenvolvimento ocorrem no epitélio seminífero, no qual as células menos diferenciadas se localizam na membrana basal do mesmo e durante as divisões celulares, vão migrando do compartimento basal para o adluminal através das junções entre as células de Sertoli adjacentes, atravessando a barreira hemato-testicular até a espermiação na luz do túculo seminífero (MRUK; CHENG, 2004).

O processo de espermatogênese em bovinos dura em média 60 dias, sendo dividida em três fases (RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2000; LEITE, 2008). A primeira,

espermatoctogênese é caracterizada por divisões mitóticas das células germinativas, na qual a primeira divisão resulta em células tronco germinativas (espermatoctônias tipo A) e espermáticos primários (provenientes de espermatoctônias tipo B), para isso ocorre uma divisão mitótica das espermatoctônias A1 em células mais diferenciadas nomeadas espermatoctônias A2, A3, intermediárias, B1 e B2, prosseguindo as divisões das células tipo B originando dois espermáticos primários. A segunda, meiose tem como função a redução do número de cromossomos formando a célula haplóide, levando à recombinação e segregação do material genético, assim os espermáticos primários provenientes da primeira etapa replicam o seu DNA e entram na primeira divisão meiótica para produzir os espermáticos secundários, os quais entram rapidamente na segunda divisão meiótica formando a espermátide haplóide arredondada (O'DONNEL et al., 2001). Na terceira fase, espermogênese não ocorrem mais divisões celulares, apenas alterações morfológicas da espermátide, diferenciando-se em espermatozoide, envolvendo a formação e desenvolvimento do acrossoma e flagelo, condensação da cromatina, remodelação e alongamento do núcleo e remoção do citoplasma antes da liberação da espermátide durante a espermiação (LEBLOND; CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990), quando ocorre a liberação do espermatozoide no lúmen do túbulo seminífero. Estes espermatozoides, porém ainda não apresentam capacidade para fecundar o ovócito, assim, passam para os túbulos retos, alcançam a *rete testis* e chegam ao epidídimo onde iniciam o processo de maturação.

2.3 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

O processo tem início na cabeça do epidídimo seguindo pelo corpo até a cauda. Nele o espermatozoide passa por alterações morfológicas e bioquímicas resultantes da interação com o microambiente epididimário, adquirindo motilidade progressiva bem como potencial para sobrevivência e para o sucesso na fecundação (OLIVA et al., 2009). O segmento inicial do epidídimo está relacionado com a absorção de fluídos oriundos do testículo, a cabeça e o corpo epididimários estão envolvidos com a aquisição da motilidade progressiva, da capacidade de reconhecimento e fecundação do ovócito. Já na cauda do epidídimo ocorre o armazenamento espermático e a remoção de espermatozoides anormais que ainda não foram removidos durante o trajeto pelo epidídimo (SERRE; ROBAIRE, 1998). Durante todo esse processo, ocorre a absorção pela membrana plasmática de proteínas e glicoproteínas produzidas pelo epitélio epididimário, que estão associadas a importantes mecanismos de maturação, como o reconhecimento de sítios específicos sobre a superfície dos ovócitos durante a fecundação, formação da matriz acrossomal, ação sobre a reação acrossómica e

fecundação e destruição da gota citoplasmática do espermatozoide (HINTON; SETCHELL, 1993; TULSIANI et al., 1993; DACHEUX et al., 2003).

Finalizado esse processo, o espermatozoide é armazenado na cauda do epidídimo aguardando o momento da ejaculação para iniciar a etapa seguinte de capacitação espermática que ocorre no trato reprodutivo da fêmea, tornando assim o espermatozoide apto à fecundação.

2.4 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA

Logo após a ejaculação, o espermatozoide de mamíferos não possui capacidade de fecundar um ovócito, apesar de apresentar motilidade e morfologia madura, devem passar pelo processo de capacitação no trato reprodutivo feminino (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Assim, capacitação espermática é a capacidade de adquirir competência fecundante, entretanto, apesar da falta de conhecimento sobre todos os mecanismos envolvidos nessa etapa, acredita-se que se baseie na remoção ou mudança de estabilizadores ou fatores protetores da membrana plasmática, adquiridos após o contato com o plasma seminal ou até mesmo durante o trânsito pelo epidídimo (YANAGIMACHI, 1994).

Durante esse processo ocorrem diversas alterações fisiológicas, bioquímicas e intracelulares, incluindo remoção do colesterol da membrana plasmática levando a um aumento da fluidez e permeabilidade aos íons bicarbonato (HCO_3^-) e cálcio (Ca^{2+}) (HERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2006) com consequente elevação das concentrações intracelulares desses íons e adenosina monofosfato cíclico (AMPc), fosforilação de proteínas tirosina da membrana celular levando a mudanças na hidrodinâmica e motilidade espermática (BREITBART; NAOR, 1999). Esses fatores contribuem para o aumento da afinidade dos receptores presentes na membrana acrossomal externa com a zona pelúcida (ZP) (PUKAZHENTHI et al., 1998), posterior indução da reação acrossomal (BENOFF, 1998) e hiperatividade flagelar (NASSAR et al., 1999).

Nesse processo, o HCO_3^- realiza a ativação direta da adenilato ciclase (AC) específica que ao se ligar a PKA ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolipídeos via fosforilação da tirosina que compõe as proteínas da membrana, levando a uma alteração desta, promovendo a capacitação das células espermáticas, aumentando a afinidade pela ZP, desencadeando uma motilidade hiperativa e reação acrossomal (FLESCH; GADELLA, 2000).

As albuminas presentes no ambiente uterino realizam o efluxo de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides. A razão colesterol/fosfolipídeos da membrana plasmática é um dos fatores que definem sua fluidez e o estado da capacitação. Quanto menor a proporção, mais fluída é a membrana, permitindo maior influxo de Ca^{2+} (CROSS, 1998), HCO_3^- , e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para o meio intracelular, levando a ativação da AC, produzindo AMPc (GADELLA et al., 2001), o qual vai realizar a ativação da PKA, causando a fosforilação da serina e tirosina as quais compõe as proteínas da membrana da cabeça e da cauda do espermatozoide, causando um deslocamento de fosfolipídeos e o consequente rearranjo da arquitetura da membrana, auxiliando na capacitação espermática (BREITBART; NAOR, 1999; FLESCH; GADELLA, 2000; BREITBART, 2003). Essa diminuição do colesterol, também permite o aumento do pH intracelular, auxiliando na reação acrossomal (FLESCH; GADELLA, 2000; BREITBART, 2002).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) induzem a capacitação, uma vez que modificam diretamente a membrana plasmática estimulando a captação de Ca^{2+} . Além disso, também estimulam a atividade da fosfolipase A₂ na membrana, aumentando as concentrações de lisolipídios tornando a membrana instável. A heparina é um exemplo de GAGs importante na capacitação e reação acrossônica (COX, 1990), uma vez que remove as proteínas do plasma seminal na superfície da membrana plasmática, consideradas inibidoras da capacitação (MILLER et al., 1990; THÉRIEN et al., 1995).

Finalizada a capacitação, a etapa seguinte é a reação acrossomal. Essa reação é induzida por glicoproteínas da zona pelúcida (ZP3) (PATRAT et al., 2000), na qual ocorre uma ligação da ZP3 com o espermatozoide, levando a uma despolarização da membrana ovocitária permitindo o influxo de Ca^{2+} , inativando a bomba de sódio-potássio-ATPase, aumentando a concentração intracelular de sódio, levando a saída do íon hidrogênio, aumentando o pH intracelular (YANAGIMACHI, 1994). Assim, o espermatozoide irá penetrar a ZP, havendo uma fusão da membrana acrossomal externa e membrana plasmática, liberando enzimas acrossomais como a acrosina e a hialuronidase que dissolvem a ZP no ponto de fusão e permite que o gameta entre no espaço perivitelínico realizando a fertilização do ovócito (YANAGIMACHI, 1989; 1994).

2.5 ENDOCRINOLOGIA DA ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é regulada por diversos mecanismos inclusive endócrinos, que envolve o estímulo no hipotálamo pelo GnRH, estimulando a secreção dos hormônios FSH e LH, que agem nas células intraluminais e intersticiais descritas a seguir.

2.5.1 *Células de Sertoli*

As células de Sertoli encontram-se no interior do túbulo seminífero mantendo uma estreita relação via junções *tight junctions* com as células germinativas durante seu desenvolvimento (AMANN, 1993). Além disso, outra maneira de comunicação seria via fatores parácrinos, pela produção e secreção de proteínas das células de Sertoli, induzida pelo hormônio FSH, auxiliando no desenvolvimento das células germinativas (O'DONNEL et al., 2001). Como é o caso da proteína transportadora de andrógeno (ABP), secretada por influência do FSH e testosterona, estimulando o transporte de andrógenos pelo epidídimos. O ativador de plasminogênio (PA), outra protease secretada pela célula de Sertoli por estímulo do FSH e inibição pela testosterona, que auxilia na movimentação dos espermátocitos, podendo estar envolvida na espermiogênese e reabsorção de corpos residuais (DADOUNE; DEMOULIN, 1993). As citocinas, que influenciam a mitose e meiose das células germinativas (KRETSER et al., 1998), sendo responsáveis também pela proteção imunológica tecidual, regulação da esteroidogênese das células de Leydig, secreção de transferrina e inibição da secreção de estradiol pela célula de Sertoli (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), sintetizado pela célula de Sertoli regulada pelo FSH, estimula a diferenciação do espermátocito quando em estádio de paquíteno (DADOUNE; DEMOULIN, 1993). O lactato, produzido pela célula de Sertoli, controlado pelo FSH, insulina e IGF-1 é utilizado como fonte de energia para as células germinativas (HULEIHEL; LUNENFELD, 2004).

Em vista disso, pode-se dizer que algumas das funções das células de Sertoli são o auxílio no controle da maturação e da migração das células germinativas, síntese de proteínas e esteróides, passagem das secreções entre os compartimentos tubulares e intersticial (DADOUNE; DEMOULIN, 1993) e formação da barreira hemato-testicular (AMANN, 1993). Essa célula também é responsável pela conversão da testosterona produzida pela célula de Leydig em estrogênios e dihidrotestosterona (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Assim, é necessário que o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular

esteja funcionando de forma balanceada na produção de FSH, LH e andrógenos para a manutenção de uma espermatozogênese normal (O'DONNEL et al., 2001).

2.5.2 Células de Leydig

As células de Leydig têm como principal função a conversão de colesterol e pregnenolona (STANBENFELD; EDQVIST, 1996), induzida pelo LH para a produção de testosterona, que auxilia no desenvolvimento e manutenção da espermatozogênese e das características masculinas (O'DONNEL et al, 2001). Se houver uma síntese excessiva de LH e FSH pelos andrógenos e estrógenos, resultará na inibição por *feedback* negativo da liberação de GnRH pela testosterona (DADOUNE; DEMOULIN, 1993).

As células germinativas não apresentam receptores para andrógenos, assim a ação desses andrógenos na espermatozogênese acontece via células de Sertoli (LIU; HANDELSMAN, 2003). O estímulo das células de Leydig vai ocorrer via células de Sertoli, uma vez que não apresentam receptores para FSH, assim vai haver uma liberação de paratormônio que vai estimular o crescimento e a diferenciação das células de Leydig, aumentando os receptores de LH e a secreção de testosterona. A prolactina, o hormônio do crescimento e a insulina estimulam a formação e manutenção dos receptores de membrana de LH (DADOUNE; DEMOULIN, 1993).

Em suma, no controle endócrino o LH age nas células de Leydig promovendo a esteroidogênese e o FSH nas células de Sertoli, sendo que a testosterona é importante para o feedback negativo no controle de ambas as gonadotrofinas (LIU; HANDELSMAN, 2003). Diversas substâncias tem comprovada ação regulatória sobre as gonadotrofinas e entre elas está a Kp que discorremos a seguir.

2.6 KISSPEPTINA

A Kp, descoberta por Lee et al. (1996), teve seu gene KISS1 descrito pela primeira vez como um dos genes supressores de metástase em células malignas do melanoma. As Kp são peptídeos produtos do gene KISS1 com afinidade pelo receptor KISS1 (KISS1R), sendo este um receptor acoplado a proteína G transmembrana, anteriormente reconhecido como GPR54 (HIDEN et al., 2007; PINILLA et al., 2012). Este peptídeo atua principalmente no hipotálamo estimulando neurônios do GnRH, havendo assim uma secreção pulsátil ou tônica promovendo a liberação de LH e FSH (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2007; EZZAT et al., 2010).

Em 2003 as ações fisiológicas da Kp ganharam maior interesse, uma vez que foi provada sua influência na reprodução. Sua ação no eixo reprodutivo foi observada através de pacientes que apresentavam uma mutação inibitória na proteína G acoplada ao KISS1R, não permitindo a sua correta ativação pela Kp. A ocorrência dessa mutação está associada à ocorrência de hipogonadismo hipogonadotrófico (SEMINARA et al., 2003) que ocorre devido à falha na secreção de FSH e LH pela pituitária (DE ROUX et al., 2003). Segundo Jayasena et al. (2010), mulheres com hipogonadismo hipogonadotrópico tratadas com Kp, podem retomar a secreção das gonadotropinas. A partir da descoberta dessa mutação, diversos estudos começaram a ser realizados no intuito de desvendar as ações da Kp no sistema reprodutivo e suas biotecnologias aplicadas.

Em 2009, Roseweir e Millar desenvolveram um antagonista da Kp, o peptídeo 234 (P-234). A descoberta dessa molécula auxiliou no entendimento de diversas funções da Kp (PINEDA et al., 2010). O pré- tratamento com antagonistas de Kp pode inibir a ação do receptor KISS1R nos neurônios de GnRH (IRWIG et al., 2004, HAN et al., 2005, HERBISON et al., 2010) e consequente secreção de gonadotrofinas (GOTTSCH et al., 2004, NAVARRO et al., 2005a, 2005b). Em ovelhas, a administração do antagonista P-234, diminuiu a amplitude do pulso de LH, levando a uma queda das concentrações médias desse hormônio (ROSEWEIR et al., 2009). Segundo uma pesquisa realizada em ratas por Pineda et al. (2010), a administração de um antagonista de Kp a partir do início do estro durante 36 horas, impediu o pico de LH pré-ovulatório. Em vista disso, pode-se concluir que o sistema KISS1/KISS1R é um regulador de extrema importância para que possa ocorrer o estímulo dos neurônios GnRH, caso ocorra algum problema nessa regulação, pode acarretar em uma supressão da secreção de GnRH (THOMPSON et al., 2004, PINILLA et al., 2012).

2.6.1 *Ação no trato reprodutivo*

A presença do gene codificador desse peptídeo (KISS1) e/ou mRNA KISS1R ou proteína, já foi constatada na periferia de diversos tecidos reprodutivos, incluindo tecidos ovarianos (CASTELLANO et al., 2006; GAYTÁN et al., 2009; HSU et al., 2014), oviduto (GAYTÁN et al., 2009; HSU et al., 2014) e testículos de homens e roedores, mais precisamente nas células de Leydig (OHTAKI et al., 2001; ZHAO et al., 2010; ANJUM et al., 2012; HSU et al., 2014; SALEHI et al., 2015). A Kp e seu receptor também foram detectados em espermatozoides humanos (PINTO et al., 2012) e KISS1R em

espermatozoides de camundongos (HSU et al., 2014), sugerindo um papel regulatório na reprodução.

A Kp no epitélio ciliado do oviduto e o KISS1R no espermatozoide sugerem que este peptídeo participe de alguns processos importantes que ocorrem neste local como a capacitação espermática, reação acrossômica e fecundação (ROLDAN et al., 1994; VISCONTI, 2009; CHANG; SUAREZ, 2010).

Nas células testiculares de ratos adultos foi constatada a expressão do gene KISS1 em células intersticiais e do seu receptor KISS1R nos túbulos seminíferos. Além disso, foi detectada a presença do KISS1R em espermátides, espermatozoides maduros e células de Leydig, porém essa presença não foi constatada em espermatogônias, espermatócitos ou células de Sertoli nos túbulos seminíferos. Já a presença da Kp foi detectada em células de Leydig, corpo residual de espermátides alongadas (células transicionais do desenvolvimento do espermatozoide) e epitélio do epidídimos (HSU et al., 2014).

Alguns dos efeitos da Kp nos espermatozoides, são resultantes da sua capacidade de modular localmente a secreção de GnRH, uma vez que já foi demonstrada a presença de GnRH, da subunidade GnRH α e de seu receptor em diversos tecidos hipotalâmicos além de oviduto, células da granulosa ovariana e espermatozoides (IZUMI et al., 1985; MORALES, 1998; LEE et al., 2000). Esse hormônio também aumenta a capacidade dos espermatozoides de se ligarem à zona pelúcida, mas não é capaz de induzir a reação acrossômica ou de modificar o padrão de motilidade nos espermatozoides humanos (MORALES, 1998). Segundo Saadeldin et al. (2012), a Kp age como um agonista ativando localmente seu GnRH α subordinado, aumentando a síntese de LH, agindo nesse caso, na maturação ovocitária *in vitro*. De fato, estudos *in vitro* em que a Kp-10 foi adicionada a culturas de células pituitárias derivadas de ovelha (SMITH et al. 2008), porcos (SUZUKI et al., 2008) e gado (SUZUKI et al., 2008, EZZAT et al., 2010) demonstraram que a Kp-10 foi capaz de aumentar a concentração de LH no meio de cultura.

Esse peptídeo também promove um aumento da concentração de Ca $^{2+}$ intracelular nos espermatozoides induzindo alterações significativas na motilidade espermática (PINTO et al., 2012; HSU et al., 2014), capacitação e reação acrossômica (COSTELLO et al., 2009) e nos ovócitos levando a maturação nuclear e citoplasmática (CONSTANTIN et al., 2008; LIU et al., 2008; CASTAÑO et al., 2009; KROLL et al. 2011; SAADELDIN et al., 2012).

A Kp ao estimular a secreção de GnRH, exerce uma relação com a maturação das gônadas (MESSAGER et al., 2005). O GnRH tem como função regular a secreção do

hormônio FSH e LH através da pituitária. O LH atua sobre as gônadas regulando a gametogênese e o FSH tendo influência sobre a esteroidogênese (MASON et al., 2007). Em experimentos realizados com ratos pode ser observada a presença de receptores de Kp, Kiss-1r, em ovários, nas células da teca de folículos com intenso crescimento folicular e no corpo lúteo (CL) (CASTELLANO et al., 2006), células da granulosa de folículos pré ovulatórios, células do cumulus e citoplasma do ovócito (HSU et al., 2014) . Em vista disso, alguns estudos demonstram que a administração exógena da Kp está envolvida no aumento dose-dependente dos níveis do hormônio LH, necessário para a ovulação em diversas espécies (MATSUI et al., 2004; SEMINARA et al., 2006; DUNGAN et al., 2006; SMITH et al., 2006). Em ratos foi demonstrado que na puberdade há um aumento na sensibilidade ao efeito estimulante da Kp em relação à resposta do GnRH/LH. A ativação de neurônios de GnRH é um fator essencial para o início da puberdade (RICHTER et al., 2006). Experimentos realizados em ratas na fase de imaturidade sexual mostraram que a administração crônica e intermitente de Kp-10 induz a ativação precoce do eixo gonadotrófico, havendo uma precocidade na abertura vaginal, aumento do LH e estradiol e aumento no peso do útero (NAVARRO et al., 2004). Assim, percebe-se que a Kp age indiretamente estimulando a foliculogênese, espermatogênese, esteroidogênese, além de promover a ovulação nas fêmeas (MACEDO et al., 2013; OKAMURA et al., 2013).

Já foram detectados a presença da Kp e seu receptor em células do trofoblasto no início da gestação em humanos (ROSEWEIR et al., 2012) e durante o pico da invasão trofoblástica em ratos (HIDEN et al., 2007). E vista disso, estudos descobriram que a Kp pode atuar na regulação da invasão de trofoblastos (TERAO et al., 2004; HIDEN et al., 2007; ROSEWEIR et al., 2012), reprimindo esse processo crítico e essencial para o desenvolvimento embrionário e placentário, resultando em gestações anormais (HIDEN et al., 2007). Segundo Saaldeldin et al. (2012), embriões cultivados em meios suplementados com Kp apresentaram sua viabilidade trofoblastica afetada, apresentando de 3 a 5 vezes mais degeneração do que os cultivados sem esse peptídeo.

A administração de Kp também pode ser usada como um novo método de desencadear a ovulação em seres humanos, auxiliando assim no tratamento de alguns problemas reprodutivos. Em estudo realizado por Jayasena et al. (2014), a Kp-54 foi aplicada em mulheres no intuito de induzir a ovulação e maturação ovocitária para posterior fertilização por injeção intracitoplasmática, resultando em aumento dos níveis de LH sérico favorável, maturação eficiente de ovócitos e competência para gerar embriões e

bebês humanos viáveis, diminuindo assim a chance de ocorrer complicações como a síndrome de hiperestimulação ovariana moderada a grave (OHSS), uma complicaçāo grave da terapia com gonadotrofina.

Neste contexto, a descoberta da ação da Kp no controle da fertilidade, por atuar em diferentes níveis, desde núcleos hipotalâmicos (REDMOND, 2011) à gametas (PINTO et al., 2012; SAADELDIN et al., 2012; HSU et al., 2014), abriu uma janela para o entendimento de como se dá a modulação da ovogēnese, fertilização e desenvolvimento embrionário/fetal, podendo ser utilizada como ferramenta para auxiliar no aperfeiçoamento do protocolo da PIVE.

2.7 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÓES (PIVE)

Uma biotécnica importante para explorar o potencial genético dos rebanhos brasileiros é a PIVE, a qual viabiliza uma diminuição do intervalo entre gerações (fêmeas bovinas a partir dos seis meses de idade), além de permitir a introdução/intensificação do uso do material genético de fêmeas identificadas como geneticamente superiores e a obtenção de embriões a partir de fêmeas consideradas incapazes de produzirem descendentes por meio das técnicas convencionais (MELLO et al., 2016). Além disso, otimiza o uso do material genético dos machos, permitindo a produção de diversos embriões com o uso de uma única palheta de sêmen além do uso de touros diferentes para uma única doadora (BRACKETT; ZUELKE, 1993; SANTL et al., 1998; BUENO; BELTRAN, 2008). Esta biotécnica também permite testar novos fatores e técnicas com o intuito de comprovar suas ações no trato reprodutivo e nas taxas de produção. Três etapas compõem a produção *in vitro* de embriões: a maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV).

2.7.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Na etapa de maturação, os ovócitos recebem estímulos provenientes do meio no qual estão inseridos para finalizar a meiose envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (DADARWAL et al., 2015).

Durante todo o período de desenvolvimento do ovócito este encontra-se retido no ambiente folicular no estádio de diplóteno da prófase I ou também chamado estádio de vesícula germinativa (VG), mantido pelas altas concentrações de AMPc produzido pelas células da granulosa, chegando ao ovócito pelas junções gap (VAN DEN HURK; ZHAO,

2005). No processo de maturação nuclear *in vitro*, a meiose se reinicia a partir do momento em que a comunicação entre o ovócito e as células foliculares é desfeita. A maturação nuclear é caracterizada pela saída do ovócito do estágio de diplóteno da prófase da meiose I, passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I, terminando a primeira divisão meiótica e inicia a fase de metáfase II, na meiose II (GONÇALVES et al., 2007). Posteriormente, os cromossomos são divididos em dois grupos, sendo que metade permanece no ovócito (célula haplóide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar (CAN et al., 2003), ocorrendo a liberação deste, permanecendo nesse estádio até a fecundação.

A maturação citoplasmática envolve uma série de alterações bioquímicas e estruturais que ocorrem simultaneamente à maturação nuclear. Durante esta etapa o ovócito adquire condições para bloquear a poliespermia, descondensar o núcleo do espermatozoide e formar o pró-núcleo após a fecundação, além de realizar a redistribuição de organelas intracelulares com migração de mitocôndrias para uma posição perinuclear e acúmulo de grânulos corticais ao longo do citoplasma (VAN DER HURK; ZAO, 2005), maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (CRAN, 1989; WANG et al., 2003). Além disso, também ocorre a formação de um estoque de transcritos e proteínas do citoplasma do ovócito na fase inicial de desenvolvimento embrionário até o estádio de oito/dezesseis células (FERREIRA et al., 2008), quando ocorre a ativação do genoma embrionário e a síntese de novas proteínas passa a ser realizada pelos transcritos embrionários ao invés dos transcritos maternos, denominado de transição materno zigótica (STITZEL; SEYDOUX, 2007).

Durante o processo *in vitro*, todas as características como nutrientes, atmosfera, entre outros, devem ser controladas, no intuito de mimetizar ao máximo o ambiente *in vivo* (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Em vista disso, o período de maturação *in vitro* para ovócitos bovinos varia de 18 a 24 horas em estufa contendo 5% de CO_2 e ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007). Existem diferentes meios e protocolos desenvolvidos e testados para a realização MIV, o mais utilizado é o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199) enriquecido com proteínas, hormônios (LH e FSH), aminoácidos, tampões para manutenção do pH, antibióticos e outros suplementos.

Caso ocorra algum erro em alguma etapa, levando a uma maturação inadequada, a fecundação se torna inviável aumentando a ocorrência de poliespermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2005).

2.7.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Finalizado o período de maturação, o ovócito já apto a fecundação se funde com o espermatozoide capacitado, dando início à exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose, na qual o núcleo espermático é descondensado formando o pró núcleo masculino, que migra para o centro do ovócito, se desintegra ocorrendo a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem (YANAGIMACHI, 1994).

Na FIV ocorre em uma tentativa de mimetizar o ambiente *in vivo* e suas reações, para que isso ocorra é necessário que os meios utilizados propiciem um ambiente ótimo para os espermatozoides. O meio FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) tem sido o mais utilizado em protocolos de FIV de embriões bovinos, contém em sua composição fatores capazes de induzir a capacitação espermática, como é o caso da heparina (IRITANI; NIWA, 1977).

O co-cultivo, cultivo com a presença do ovócito e do espermatozoide, tem duração de 18 a 22h, realizado em estufa a uma temperatura de 39 °C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada. Os espermatozoides viáveis congelados na palheta de sêmen devem ser descongelados e separados do plasma seminal, crioprotetores, diluentes e dos espermatozoides inviáveis. Um dos métodos de separação de espermatozoides mais utilizados para bovinos é o gradiente de *Percoll*, no qual após a seleção, são diluídos para uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides viáveis/mL (GONÇALVES et al., 2007).

O *Percoll* é composto por partículas de sílica coloidal de 15-30 nm de diâmetro, coberto com polivinilpirrolidona (PVP). Nesse método, diferentes concentrações são preparadas para que seja criado o gradiente necessário, assim o sêmen é colocado acima desses diferentes gradientes e centrifugado para que ocorra a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes (AVERY; GREVE, 1995; PARRISH et al., 1995). Durante a centrifugação, a maioria dos espermatozoides mortos e com baixa motilidade ficam presos entre as partículas do meio e ao final é formado um *pellet* com as células móveis que serão utilizadas para a FIV.

2.7.2.1 Capacitação espermática

Para que a fecundação dos ovócitos possa ocorrer, os espermatozoides precisam estar previamente capacitados para que o processo de reação acrossômica consiga ser desencadeado pelo estímulo da zona pelúcida (ASSUMPÇÃO et al., 2002). Para que essas alterações consigam acontecer no ambiente *in vitro*, são adicionados ao meio alguns

agentes capacidores como a heparina, Ca^{2+} (YANG et al., 1993), albumina sérica bovina (BSA) e o HCO_3^- .

A heparina é um GAGs utilizado para favorecer a interação ligante receptor entre o espermatozoide e as células do cumulus, promovendo desta forma a capacitação espermática sem induzir a reação acrossônica (O'FLAHERTY et al., 1999).

O HCO_3^- ativa a AC do espermatozoide se ligando a PKA, essa via então ativa de forma direta ou indireta o deslocamento de fosfolipídios pela fosforilação da proteína tirosina, resultando na assimetria da membrana plasmática e consequente capacitação das células espermáticas (FLESCH; GADELLA, 2000). Em estudo *in vitro* realizado por Colenbrander et al. (2003) com espermatozoides eqüinos, foi provado o importante papel do bicarbonato no processo da capacitação, atuando na distribuição dos lipídeos, como citado acima.

O BSA nos meios de capacitação *in vitro* realiza a extração de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, levando a um deslocamento dos fosfolipídios e um novo rearranjo da sua estrutura (YANAGIMACHI, 1994, FLESCH; GADELLA, 2000).

O Ca^{2+} tem papel nos processos de capacitação, uma vez que acredita-se que ele realiza uma neutralização das cargas negativas da superfície externa da membrana acrossomal e da superfície interna da membrana plasmática, levando a uma aproximação para realização da fusão da vesícula acrossomal (SHIDU; GURAYA, 1989). Também é responsável pela hiperatividade e reação acrossomal e motilidade flagelar (FLESCH et al., 2000; GABALDI et al., 2002).

Pode-se perceber então que a capacitação do espermatozoide está associada a um aumento na fosforilação de tirosina, o qual depende da presença de BSA, Ca^{2+} e HCO_3^- no meio, influenciando a capacitação (SALICIONI et al., 2007). Caso algum desses constituintes do meio não esteja presente, a fosforilação de tirosina e a capacitação são impedidas. Também está estabelecido que a fosforilação de tirosina está ligada a uma via de PKA. Seu envolvimento demonstra que caso ocorra a ausência de algum dos constituintes do meio, substâncias análogas permeáveis a AMPc são capazes de induzir o aumento da fosforilação de tirosina, não ocorrendo o impedimento da capacitação (VISCONTI, 2009).

2.7.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após as etapas de maturação e fecundação, o zigoto passa para a etapa de cultivo *in vitro* e dá início as divisões celulares até a formação do blastocisto. Durante o

desenvolvimento embrionário quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino, a transição materno-zigótica, período pós fecundação quando o embrião ainda é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática até a ativação do genoma embrionário é considerada um momento crítico, ocorrendo nos bovinos no estádio de 8 a 16 células (BLONDIN; SIRARD, 1995; MINAMI, 1996; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; CAMARGO et al., 2001).

Para que o zigoto consiga transpor esse período de forma eficiente, este não pode ser submetido à nenhuma carência. Assim o meio de cultivo deve apresentar condições semelhantes às encontradas *in vivo*. Nesse contexto, diversos sistemas de cultivo já foram usados durante esta fase de desenvolvimento embrionário (GALLI; LAZZARI, 1996), como a suplementação dos meios de cultivo com aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, mudanças nas condições de temperaturas e atmosfera gasosa (NAGAI, 2001), co-cultivo com células epiteliais do oviduto bovino (CEOBO), células da granulosa, vesículas trofoblásticas ou em monocamadas de células diferenciadas como BRL (buffalo rat liver) ou células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo) (GONÇALVES et al., 2007; BUENO; BELTRAN, 2008). Esse tipo de co-cultivo apresenta concentrações variadas nos nutrientes, podendo não ser a ideal para o desenvolvimento dos embriões (GORDON, 1994; GONÇALVES et al., 2002), por isso esse método foi substituído apenas pelo uso de meios de CIV, sendo em termos gerais o *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) principal meio utilizado.

O tempo de CIV variar de sete a nove dias a uma temperatura de 39 °C, atmosfera de baixa tensão de O₂ a 5% de CO₂ e umidade saturada. Em geral, no terceiro dia do cultivo avalia-se a taxa de clivagem e no sétimo a taxa de blastocisto. Os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o nono dia, para que a taxa de eclosão *in vitro* possa ser avaliada (GONÇALVES et al., 2007).

2.8 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Diversas biotécnicas estão sendo desenvolvidas para uma realização mais eficiente da avaliação da capacidade espermática, entre elas pode-se citar os sistemas de avaliação computadorizado das características seminais, uso de sondas fluorescentes na avaliação de estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, entre outras (DE ARRUDA et al., 2005).

A análise de fluorescência é um indicador sensível e específico quanto ao estado de certas moléculas, podendo assim ser utilizada para medir as mudanças metabólicas em células vivas (HAUGLAND, 2001). Na andrologia a utilização dessas sondas fluorescentes é indicada para avaliar integridade e função de estruturas específicas dos espermatozoides (PETERSON et al., 1974; HALANGK et al., 1984), podendo ser utilizadas isoladamente ou em combinações. Portanto, com o uso das sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, podem ser avaliadas a integridade de membrana plasmática e acrossomal, intensidade do potencial mitocondrial, entre outros.

Segundo Graham et al. (1990) foi demonstrado que com o uso combinado das sondas, pelo menos três compartimentos dos espermatozoides bovinos podem ser avaliados simultaneamente, no caso utilizando uma para integridade de membrana plasmática, outra para potencial mitocondrial e uma terceira para integridade de acrossoma.

2.8.1 Avaliação de Membrana Plasmática

A membrana plasmática atua como uma barreira entre o ambiente intra e extracelular, tornando-se responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico celular. Qualquer dano a essa estrutura, pode levar à perda da homeostase e morte da célula (AMANN; PICKETT, 1987). Dessa forma pode-se perceber que é fundamental a integridade da membrana plasmática para que o espermatozoide consiga sobreviver durante o tráfego no trato genital feminino e manutenção da sua capacitação até a fecundação (PARKS; GRAHAM, 1992).

Diversos estudos citam o uso do Iodeto de Propídeo (IP) como sonda fluorescente para avaliação da integridade da membrana plasmática, sendo realizado na maioria dos casos por microscopia de epifluorescência com o uso de microscópio especializado ou por citometria de fluxo (FARAH et al., 2013). Essa sonda consegue penetrar em membrana plasmática lesada e por possuir afinidade com receptores localizados no DNA, se liga a eles corando em vermelho o núcleo dessas células (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; BAYYARI et al., 1990; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; ARRUDA, 2000, ARRUDA et al., 2003).

2.8.2 Avaliação de Acrossoma

A manutenção da integridade do acrossoma é crucial para que ocorra a reação acrossomal, com consequente penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão com o ovócito, liberando as enzimas hidrolíticas e proteolíticas, realizando assim a

fecundação (DIAZ-PERES et al., 1988; FLESCH; GADELLA 2000; ARRUDA et al., 2010).

Diferentes técnicas de fluorescência podem auxiliar a verificar a integridade do acrossoma, uma delas se dá pela afinidade das aglutininas como, por exemplo, *Pisum sativum* – PSA, às glicoproteínas da membrana acrossomal. Porém para que o acrossoma possa ser observado em microscopia de epifluorescência, essas aglutininas devem ser conjugadas com fluoresceínas como por exemplo, o isotiocionato de Fluoresceína (FITC), revelando uma marcação verde amarelada para acrossomas lesados (GRAHAM et al., 1990; FARLIN et al., 1992).

2.8.3 Avaliação do Potencial Mitocondrial

As mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária do flagelo e a síntese de ATP é coordenada pelo potencial de membrana mitocondrial interno (DUCHEN et al., 1993). A produção de ATP funciona como uma suplementação energética para que ocorra os batimentos flagelares, sendo então indispensável para a motilidade espermática (COSSON, 1996).

As carbociaminas como, por exemplo, o iodeto de 5,5', 6,6'-tetrachloro-1, 10, 3, 30-tetraetylbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um dos componentes com sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial. Essa sonda identifica populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana com mudança no padrão de cor, no qual a cor altera de verde (médio a baixo potencial) para laranja-avermelhada (alto potencial) de acordo com o aumento do potencial de membrana mitocondrial (REERS et al., 1991; COSSARIZZA et al., 1993; MARTINEZ-PASTOR et al., 2004; VARNER et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

O sucesso da PIVE é dependente da qualidade do ovócito e de suas boas características morfológicas (SENE DA et al., 2001). Além disso, a capacitação espermática, também é um fator importante para que ocorra a fecundação proporcionando maior fertilidade (PÉREZ et al., 1997). Porém os índices de eficiência da técnica variam entre 30 a 40% dos ovócitos atingindo a estágio de blastocistos (LONERGAN; FAIR, 2008; MAPLETOFT, 2013). Em vista disso, diversos métodos ou mesmo moléculas estão sendo estudadas com o objetivo de aprimorar a técnica e aumentar os índices de produção embrionária.

Nesse contexto, a ação da Kp vem sendo explorada nas diversas etapas da PIVE. A presença desse peptídeo e seu receptor (KISS1R) já foi constatada na periferia de diversos tecidos reprodutivos, incluindo espermatozoides humanos (PINTO et al., 2012) e KISS1R em espermatozoides de camundongos (HSU et al., 2014). Além disso, a presença da Kp no oviduto e seu receptor no espermatozoide sugere que este peptídeo participe de alguns processos importantes que ocorrem neste local como a capacitação espermática, reação acrossônica e fecundação (ROLDAN et al., 1994; VISCONTI, 2009; CHANG; SUAREZ, 2010), demonstrando um papel regulatório na reprodução.

Essas descobertas serviram como incentivo para que fosse estudada a ação *in vitro* desse peptídeo e de seu antagonista P-234, no processo de seleção espermática quanto à viabilidade dos espermatozoides e influência nas taxas de produção de embriões bovinos.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adição da Kp no processo *in vitro* de seleção espermática, quanto à viabilidade dos espermatozoides bovinos e taxas de produção de embriões.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a ação da Kp e seu antagonista na viabilidade dos espermatozoides quanto à integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrosomal e potencial mitocondrial, além de motilidade e vigor, após processo de seleção espermática.
- b) Verificar se a Kp e seu antagonista P-234, durante o período supracitado, regulam a função espermática, modulando a FIV.

5 HIPÓTESES

- a) O uso da Kp no meio de seleção da FIV favorece o aumento das taxas de produção embrionária em relação ao grupo controle e grupo antagonista.
- b) Os espermatozoides tratados com o peptídeo 234 (antagonista) no meio de seleção da FIV apresentam menores taxas de fertilização e produção embrionária do que os espermatozoides do grupo controle.
- c) O uso da Kp no meio de seleção da FIV leva a uma melhora na manutenção da integridade da membrana plasmática, acrossomal e aumento do potencial mitocodrial.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 REAGENTES

Os reagentes e sondas utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis MO, USA). A Kisspeptina-10 murina (YNWNSFGLRY-NH2) e o antagonista P-234 (d-Ala-Asn-Trp-Asn-Gly-Phe-Gly-D-Trp-Arg-Phe) foram fabricados pela empresa GenScript Biotech (Nova Jersey, EUA). O FSH (Folltropin®) e o LH (Lutropin-V®) foram produzidos pela Bioniche Inc., (Belleville, Canadá) e o JC-1 foi adquirido da empresa Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

6.2 COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

O presente estudo foi submetido e isento de autorização de protocolo de Comitê de Ética sob número de registro A005/17, uma vez que o material utilizado não foi coletado a partir de manipulação direta de animais.

6.3 LOCAL E ANIMAIS

Os ovários foram coletados de vacas em abatedouro-frigorífico no município de Uberlândia-MG, variando em raça, idade e peso dos animais. O transporte do frigorífico ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia ocorreu em garrafa térmica com temperatura entre 35°C a 38°C, em um período máximo de quatro horas.

6.4 DESENHO EXPERIMENTAL

- 20 ovócitos/tratamento/réplica: 100 ovócitos/réplica
- 60 blastocistos de cada tratamento
- 1 palhetas de sêmen para cada tratamento por réplica (5 palhetas/réplica)
- 11 réplicas

DESENHO EXPERIMENTAL

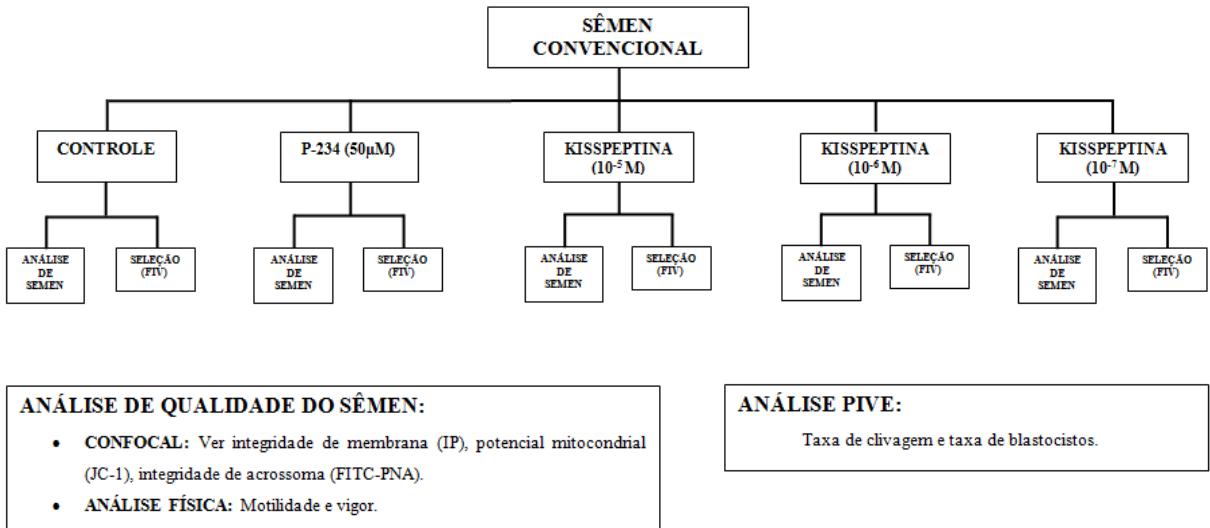


Figura 1. Experimento – influência da kisspeptina na etapa de seleção espermática para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

6.5 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OVÓCITOS (COCS)

Imediatamente após a chegada dos ovários, os ovócitos foram obtidos pelo método de aspiração dos folículos ovarianos com diâmetro entre 3-8 mm, punctionados com o auxílio de uma agulha calibre 18G acoplada a uma seringa de 5 mL. O fluido folicular obtido foi depositado em tubos plásticos de 15 mL, deixados em repouso em banho maria (35°C à 38°C) por 10 minutos para sedimentação e formação de um *pellet* posteriormente transferido para placas de Petri e avaliado sob um microscópio estereoscópico (Olympus Optical®, modelo SZ-40/SZ-ST) para o rastreamento dos COCs.

A classificação dos ovócitos foi realizada por um único observador, baseada no método de Leibfried e First (1979) com adaptações, em que os COCs foram classificados de acordo com sua morfologia em: grau I (núcleo e ooplasma homogêneo e com mais de 3 camadas de células do *cumulus*); grau II (COCs compactos com três ou menos camadas de células do *cumulus* e ovócito com citoplasma levemente heterogêneo); grau III (ovócitos parcialmente desnudos, mostrando remoção de células do *cumulus* em menos de um terço

da superfície da zona pelúcida), desnudos e atrésicos. Os COCs classificados em grau I e II foram utilizados para a MIV. O presente estudo totalizou 11 réplicas com a mesma qualidade e quantidade de ovócitos por tratamento.

6.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

Finalizada a seleção, os ovócitos seguiram para a etapa de MIV, na qual foram lavados duas vezes em meio de lavagem - base TCM-199 Hepes acrescida de 10% de soro fetal bovino, solução de piruvato (0,11 mg/mL) e amicacina (83 mg/mL). Após este processo os ovócitos foram lavados uma vez em meio de maturação constituído de base TCM-199 Bicarbonato acrescida de 10% de soro fetal bovino (0,11 mg/mL), amicacina (83 mg/mL), piruvato de sódio (22 µg/mL), FSH (0,5 µg/mL), LH (5 µg/mL). Foram distribuídos (10 a 15 ovócitos) em gotas do meio de maturação com 100 µL e em seguida incubados em estufa a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 22 a 24 horas. Após este período os ovócitos foram observados em microscópio estereoscópico para avaliação da expansão das células do *cumulus*, indicando a maturação ovocitária.

Após a maturação, os ovócitos foram lavados em uma gota do meio TALP-FERT acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (0,11 mg/mL), PHE (2 µM penicilamina, 1 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina), heparina (10 µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos essenciais (6 mg/mL), passados aleatoriamente para a placa de FIV em gotas de 100 µL identificadas para cada tratamento, do mesmo meio TALP-FERT, aptas a receber para a fecundação os espermatozoides previamente tratados nos seguintes grupos: Controle (n = 182), Percoll com adição de Kp à 10⁻⁵ M (Kp 10⁻⁵, n = 198), Percoll com adição de Kp à 10⁻⁶ M (Kp 10⁻⁶, n = 200), Percoll com adição de Kp à 10⁻⁷ M (Kp 10⁻⁷, n = 206) e Percoll com adição do antagonista P-234 à 50 µM (P-234, n = 194).

A fecundação foi realizada com sêmen selecionado do mesmo touro e partida para todas as réplicas. Uma palheta de sêmen foi descongelada para cada tratamento/réplica, totalizando 75 palhetas e uma alíquota de 10 µL de cada palheta submetida às análises de motilidade e vigor com o auxílio de um microscópio de luz, o restante seguiu para os tratamentos com Kp e P-234 durante o processo de seleção pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de Percoll® adaptado de Parrish et al. (1995). Foram montados 5 tubos de 15 mL por réplica do gradiente descontínuo de Percoll® 90% e 45% de acordo com cada tratamento proposto, sendo as diluições realizadas nos dois gradientes respeitando a concentração de cada tratamento. Os tubos foram montados com 1000 µL de

Percoll 45% e 1000 μ L de Percoll 90%, totalizando assim 2 mL dos gradientes, sendo submetidos a uma rotação de 1536 xg durante 30 minutos. Com o fim da seleção, foi avaliado novamente a motilidade e vigor, além da concentração por contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio de luz dos espermatozoides presentes no *pellet*. Posteriormente foi calculada a quantidade de meio TALP-FERT acrescida para corrigir a concentração dos espermatozoides para o preconizado para a FIV de 1×10^6 espermatozoides/mL, sendo a dose inseminante utilizada de 4 μ L, considerando assim o dia da FIV como o dia 0 (D0) do desenvolvimento embrionário. A fecundação foi realizada na placa de FIV em gotas contendo meio TALP-FERT. Os COCs juntamente com os espermatozoides foram levados para a estufa por 12 a 18 horas nas mesmas condições da maturação.

Finalizado o período da FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e lavados em meio com base SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*) suplementado com solução de piruvato (0,11mg/mL), amicacina (83 mg/mL), BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina (6 mg/mL) e soro fetal bovino (2,5%) e transferidos para a placa de cultivo CIV seguindo a mesma separação de gotas/tratamento, contendo de 10 a 15 zigotos em gotas de 100 μ L do meio com base SOF e incubados a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante sete dias. No D2 e D7 foram realizadas análises de produção, utilizando as taxas de clivagem e blastocistos.

6.7 ANÁLISES DAS TAXAS DE PRODUÇÃO

Quarenta e oito horas após a fecundação (D2) foi avaliada a taxa de clivagem (nº de zigotos clivados/nº de prováveis zigotos que foram para cultivo) e ao final do cultivo (D7) foi estimada a taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de prováveis zigotos que foram para cultivo), na qual os embriões foram classificados por um único observador, conforme preconizado pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). Estas avaliações foram todas realizadas com auxílio do microscópio estereoscópico.

6.8 ANÁLISE MOTILIDADE E VIGOR

A motilidade e vigor foram avaliados no momento pré e pós seleção espermática do sêmen utilizado para cada tratamento. Foi utilizada para cada análise uma alíquota de 10 μ L dos espermatozoides entre lâmina e lamínula pré aquecidas, em aumento de 100 x. A motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor, foi

referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, sendo classificado por um único observador em escores de 1 a 5 de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), sendo o escore 1 o mais lento e o 5 o mais rápido movimento progressivo uniforme.

6.9 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL MITOCONDRIAL

As estruturas foram avaliadas utilizando a combinação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1, de acordo com Celeghini et al. (2008) com modificações, no momento pré e pós seleção para cada tratamento. No momento pré, uma alíquota de 5 μ L foi retirada do sêmen e diluída em um microtubo com 145 μ L de meio TALP-SPERM acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (0,11 mg/mL). Feita a diluição do sêmen, foi acrescentado no microtubo IP (0,5 mg/mL em phosphate buffer saline - PBS), JC-1 (150 μ M em dimethylsulfoxide - DMSO) e FITC-PSA (100 μ g/mL em PBS). Amostra foi incubada durante 8 minutos a 37°C no escuro. Após a incubação, 7 μ L da amostra foi colocada em uma lâmina e recoberta por uma lamínula pré aquecidas a 37°C. No momento pós, uma alíquota dos espermatozoides selecionados foi diluída em um microtubo com 150 μ L de meio TALP-FERT seguindo os mesmos procedimentos realizados no momento pré, após a diluição. A leitura foi realizada em microscópio de varredura a laser confocal LSM 510 meta (Laser Scanning Microscope 510 meta, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no aumento de 40x sob óleo de imersão de acordo com as faixas de excitação/emissão de cada probe: IP 490/516nm, JC-1 495/519nm e FITC-PSA 510/540nm.

Foram analisados 200 espermatozoides por lâmina de cada tratamento/réplica e classificados de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda como descritas na Figura 2.

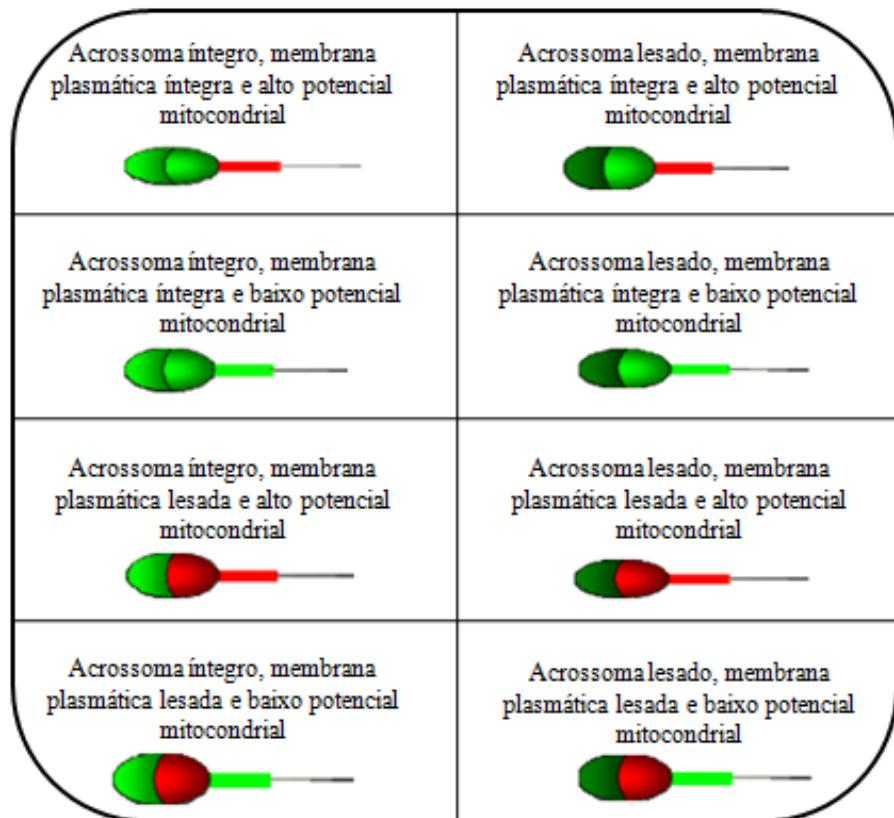


Figura 2. Representação esquemática dos padrões de coloração produzida pela associação das sondas fluorescentes – IP, JC-1 e FITC-PSA (Adaptado de CARREIRA, 2008)

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento teve como unidade experimental espermatozoides e embriões. O desenho experimental foi completamente randomizado com medidas repetidas e 13 réplicas. Os tratamentos consistiram em Controle, Kp-10 em concentração de 10^{-5} M (Kp 10^{-5}), 10^{-6} M (Kp 10^{-6}), 10^{-7} M (Kp 10^{-7}) e com adição do antagonista P-234 à 50 μ M (P-234). O tempo foi considerado antes (pré) e depois (pós) dos tratamentos.

As variáveis mensuradas referentes à qualidade seminal foram: potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossoma, motilidade e vigor e produção *in vitro* de embriões (taxas de clivagem e blastocisto).

Os dados contínuos foram analisados usando o proc GLIMMIX encaixando a tendência central de distribuição. Os dados foram testados para homogeneidade de variâncias e homocedascidade pelo proc UNIVARIATE de acordo com o teste *Shapiro-Wilk*. O modelo incluiu tratamento, réplica, momentos pré e pós e análise *two-way* como efeitos fixos. Os resíduos foram incluídos como efeitos randômicos. Além do mais, foi incluído a opção *DDFM = Satterthwaite* ao modelo para ajustar os graus de liberdade

quando as variâncias foram diferentes. O modelo não-estruturado teve a melhor informação pelo critério de *Akaike*, cujo foi escolhido como modelo final. Os dados foram analisados de forma bruta embora por *Least-squares means*. Valores são apresentados em percentagem ou média \pm EPM. Diferenças são consideradas quando $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

Neste estudo foram utilizadas 75 amostras de sêmen comercial nos quais foram avaliadas as taxas de motilidade e vigor (Figura 3) nos momentos pré e pós seleção espermática. Os resultados foram semelhantes ($P > 0,05$) entre todos os tratamentos propostos. Porém, observaram-se taxas numericamente superiores destes parâmetros nos tratamentos com adição de Kp.

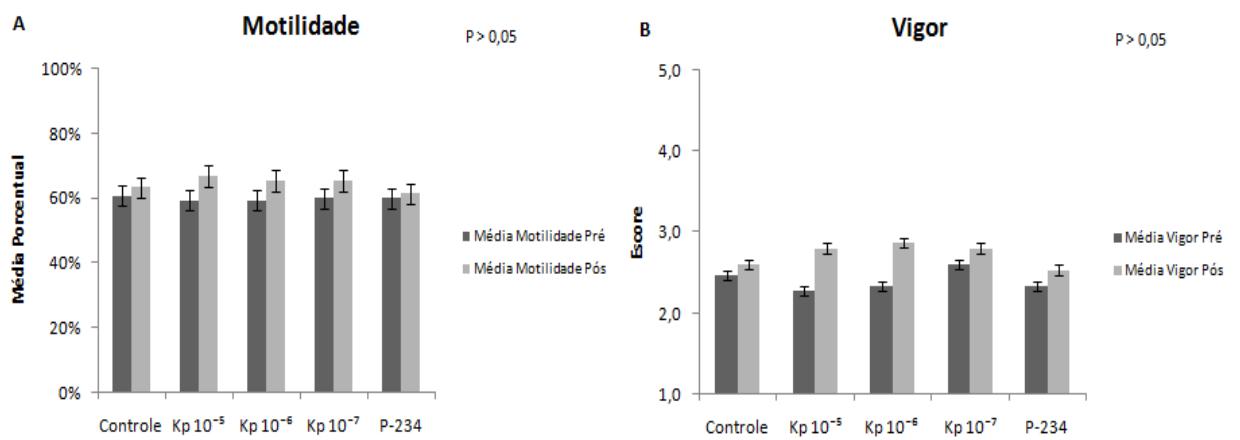


Figura 3. Médias das taxas de motilidade e escore de vigor dos tratamentos Controle, $Kp 10^{-5}$, $Kp 10^{-6}$, $Kp 10^{-7}$ e P-234 nos momentos pré e pós seleção espermática. A) Média das taxas de motilidade; B) Média dos escores de vigor.

Um total de 980 prováveis zigotos bovinos foram utilizados para a PIVE com as amostras de sêmen devidamente tratadas destinados ao cultivo. A taxa de clivagem em todos os tratamentos foi considerada alta ($>82\%$) e não diferiu ($P > 0,05$) entre grupos (Tabela 1). A porcentagem de produção de blastocistos ($n=331$) deste estudo foi maior que 29% independente do tratamento. Adicionalmente, a taxa de blastocistos foi semelhante ($P > 0,05$) entre os grupos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de clivagem e blastocisto dos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e P-234.

TRATAMENTO	CLIVAGEM/EP(%)	BLASTOCISTO/EP(%)
CONTROLE	89,0± 2,3(162/182)	37,4± 3,6(68/182)
Kp 10^{-5}	87,9 ± 2,3(174/198)	34,3± 3,4(68/198)
Kp 10^{-6}	87,5 ± 2,3(175/200)	36,0± 3,4(72/200)
Kp 10^{-7}	82,5 ± 2,7(170/206)	29,6± 3,2(61/206)
P-234	85,1± 2,6(165/194)	32,0± 3,4(62/194)

*EP = Erro Padrão

*Valores considerados estatisticamente quando $P < 0,05$.

Na análise de microscopia confocal foram avaliados 26 mil espermatozoides nos momentos pré e pós seleção espermática para intensidade de potencial mitocondrial, integridade membrana plasmática e integridade do acrossoma. No momento pós seleção espermática, relacionado ao alto potencial mitocondrial, os grupos Kp 10^{-6} e Kp 10^{-7} foram superiores ($P < 0,05$) quando comparados aos grupos Controle e P-234. Por outro lado, o tratamento com adição do antagonista P-234 foi inferior ($P < 0,05$) a todos os outros tratamentos e diferiu entre si nos momentos pré e pós seleção (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de espermatozoides com alto potencial mitocondrial nos tratamentos Controle, $K_p 10^{-5}$ M, $K_p 10^{-6}$ M, $K_p 10^{-7}$ M e P-234, no momento pré e pós seleção espermática.

TRATAMENTO	MOMENTO	MÉDIA/EPM (%)
CONTROLE	PRÉ	91,2±0,6 ^{ab}
	PÓS	89,8±0,6 ^{bc}
$K_p 10^{-5}$	PRÉ	92,7±0,5 ^a
	PÓS	90,7±0,6 ^{ab}
$K_p 10^{-6}$	PRÉ	91,7±0,5 ^{ab}
	PÓS	92,6±0,5 ^a
$K_p 10^{-7}$	PRÉ	91,3±0,6 ^{ab}
	PÓS	92,6±0,5 ^a
P-234	PRÉ	87,2±0,7 ^c
	PÓS	83,8±0,7 ^d

*EPM = Erro Padrão da Média

*^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Na avaliação da integridade de membrana plasmática entre os momentos pré e pós seleção espermática, os tratamentos com adição de K_p foram semelhantes ($P > 0,05$) entre si e ao antagonista p-234. Além disso, no momento pós seleção, o tratamento $K_p 10^{-6}$ foi superior ($P < 0,05$) ao grupo Controle (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem média de espermatozoides com integridade de membrana plasmática nos tratamentos Controle, $K_p 10^{-5}$ M, $K_p 10^{-6}$ M, $K_p 10^{-7}$ M e P-234, no momento pré e pós seleção espermática.

TRATAMENTO	MOMENTO	MÉDIA/EPM (%)
CONTROLE	PRÉ	88,8±0,6 ^{abc}
	PÓS	87,9±0,6 ^c
$K_p 10^{-5}$	PRÉ	91,5±0,5 ^a
	PÓS	88,9±0,6 ^{abc}
$K_p 10^{-6}$	PRÉ	89,7±0,6 ^{abc}
	PÓS	90,7±0,6 ^{ab}
$K_p 10^{-7}$	PRÉ	89,6±0,6 ^{bc}
	PÓS	90,2±0,6 ^{abc}
P-234	PRÉ	88,8±0,6 ^{abc}
	PÓS	90,5±0,6 ^{abc}

*EPM = Erro Padrão da Média

*^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Em geral, na avaliação da integridade de acrossoma os tratamentos com adição de K_p foram semelhantes ($P > 0,05$) entre si e ao antagonista P-234. O tratamento $K_p 10^{-6}$ apresentou resultado superior ($P < 0,05$) ao grupo Controle no momento pós seleção (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem média de espermatozoides com integridade de acrosssoma nos tratamentos Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M e P-234, no momento pré e pós seleção espermática.

TRATAMENTO	MOMENTO	MÉDIA/EPM (%)
CONTROLE	PRÉ	89,5±0,6 ^{bc}
	PÓS	89,1±0,6 ^c
Kp 10^{-5}	PRÉ	92,5±0,5 ^a
	PÓS	90,9±0,6 ^{abc}
Kp 10^{-6}	PRÉ	91,1±0,6 ^{abc}
	PÓS	91,8±0,5 ^{ab}
Kp 10^{-7}	PRÉ	91,2±0,6 ^{abc}
	PÓS	91,4±0,6 ^{abc}
P-234	PRÉ	91,8±0,5 ^{ab}
	PÓS	90,8±0,6 ^{abc}

*EPM = Erro Padrão da Média

*^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

A associação significativa e positiva entre as variáveis potencial mitocondrial, integridade de membrana e integridade de acrosssoma foi observada após a análise de correlação (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de correlação entre os fatores alto potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma no momento pós seleção espermática.

VARIÁVEL	INTEGRIDADE		
	ALTO POTENCIAL MITOCONDRIAL	DE MEMBRANA PLASMÁTICA	DE ACROSSOMA
ALTO POTENCIAL MITOCONDRIAL	1	0,80502*	0,80336*
INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA	-	1	0,84346*
INTEGRIDADE DE ACROSSOMA	-	-	1

* $P < 0,0001$

As colorações espermáticas obtidas pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1, no momento pré e pós seleção para cada tratamento, podem ser observadas na Figura 4.

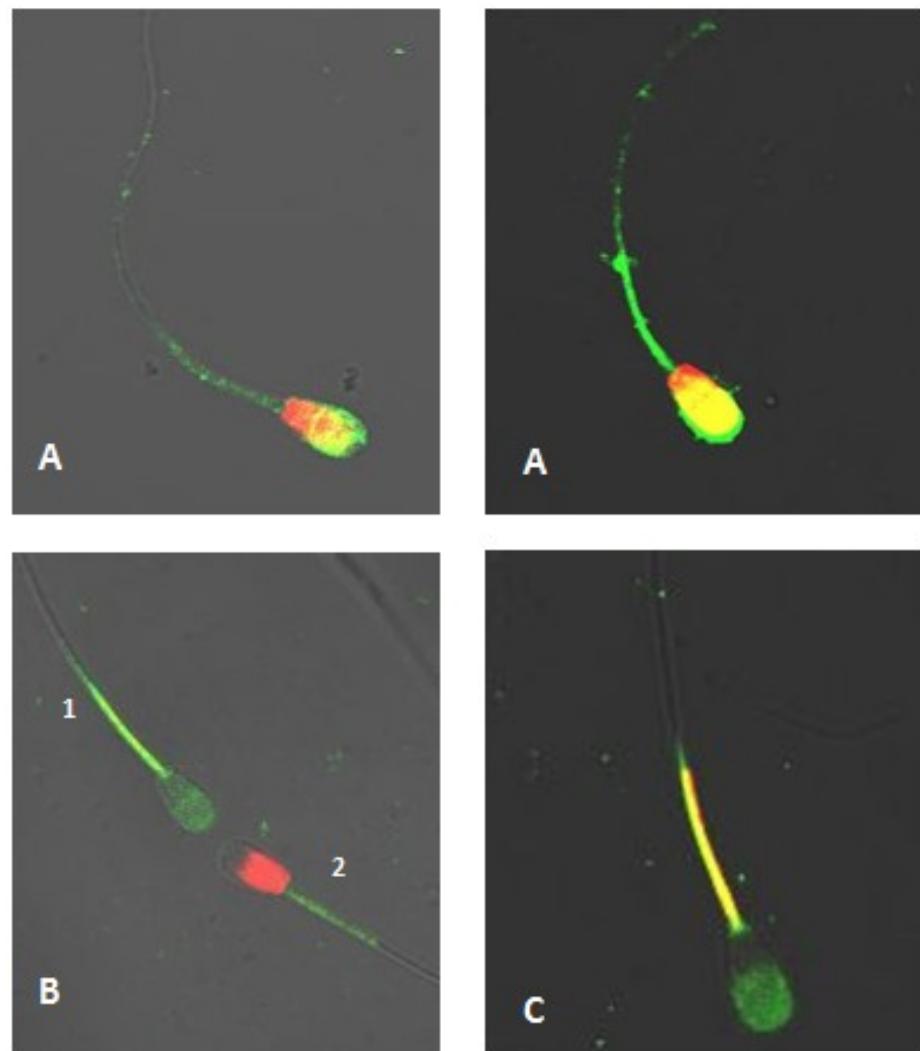


Figura 4. Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes IP, FTIC-PSA e JC-1 (aumento 40x). A) Célula com membrana plasmática lesada, acrosoma lesado e baixo potencial mitocondrial; B1) Célula com membrana plasmática íntegra, acrosoma íntegro e baixo potencial mitocondrial; B2) Célula com membrana plasmática lesada, acrosoma íntegro e baixo potencial mitocondrial; C) Célula com membrana plasmática íntegra, acrosoma íntegro e alto potencial mitocondrial.

8 DISCUSSÃO

Esse trabalho avaliou o efeito da adição da Kp e seu antagonista P-234 no processo de seleção espermática, quanto à viabilidade dos espermatozoides bovinos. A capacitação espermática é o processo necessário para que o espermatozoide se torne apto a fecundar o ovócito. No processo *in vitro* são adicionados alguns agentes capacitores ao meio como a heparina, Ca^{2+} (YANG et al., 1993), BSA e HCO_3^- , no intuito de mimetizar o processo *in vivo* que ocorre no trato reprodutivo feminino. Alguns estudos demonstram que a Kp pode auxiliar na capacitação espermática, reação acrosomal e fecundação devido a diversos fatores como sua presença no oviduto e de seu receptor em espermatozoides (ROLDAN et al., 1994; VISCONTI, 2009; CHANG; SUAREZ, 2010).

No presente estudo, não foi observado efeito dos tratamentos nas variáveis de qualidade física do sêmen (motilidade e vigor) e taxas de produção embrionária (clivagem e blastocistos). Embora se tenha observado uma melhor qualidade física do sêmen numericamente (Figura 3). Isso pode ter ocorrido, devido à boa qualidade de ovócitos e espermatozoides utilizados no experimento, influenciando em boas taxas de produção. Assim a Kp teria uma ação maior em estruturas menos qualificadas. Concordando com esta hipótese, estudo anterior relatou que a Kp na concentração de 10^{-5} M induziu mudanças significativas na motilidade de espermatozoides humanos (PINTO et al., 2012), uma vez que estes apresentam uma qualidade inferior aos espermatozoides bovinos. Quanto a produção embrionária, resultados encontrados por Hsu et al. (2014) diferiram do trabalho atual, no qual foi demonstrado que o tratamento com o antagonista da Kp durante a capacitação espermática, reduziu as taxas de fertilização dos espermatozoides de camundongos. Além da diferença experimental de espécie, uma vez que a dosagem de antagonista utilizado neste trabalho com bovinos foi baseada na dosagem de 50 μM utilizada no trabalho de Hsu et al. (2014) em camundongos, outro ponto a ser destacado foi o período de contato das amostras com o peptídeo. No trabalho de Hsu et al. (2014) as amostras ficaram em contato com o antagonista por um período de 2 horas e no presente trabalho o período foi de 40 minutos. O peptídeo P-234 utilizado no presente estudo provavelmente não preveniu ou inibiu de forma eficaz a ativação do receptor, assim como encontrado no trabalho de Albers-Wolthers et al. (2017), no qual os antagonistas análogos de Kp P-234, P-271, P-354 e P-356 não apresentaram efeito *in vitro* em células CHEM1 hematopoiéticas de ratos que expressam de forma estável o GPR54 humano. Diferindo,

porém de resultados encontrados por Pinto et al. (2012) no qual os efeitos encontrados da Kp na motilidade espermática foram inibidos na presença do antagonista P-234.

A adição da Kp em menores concentrações no meio de seleção espermática favoreceu a atividade mitocondrial. Além disso, a adição do antagonista P-234 foi prejudicial a este parâmetro. Estes resultados nos levam a hipótese de que a concentração equilibrada da Kp no meio, favorece a entrada de Ca^{2+} intracelular nos espermatozoides (PINTO et al., 2012; HSU et al., 2014) induzindo a capacitação, hiperativação e reação acrossomal, agindo também como elemento auxiliar para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal (DARSZON et al., 1999). A Kp se liga ao seu receptor KISS1R e induz a cascata típica dos receptores acoplados a proteína G, promovendo uma ativação da fosfolipase C (PLC), seguida de hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O acúmulo de IP3 nas células leva a uma mobilização de Ca^{2+} das reservas intracelulares (CASTAÑO et al., 2009, ROA et al., 2008). A hiperativação é regulada por Ca^{2+} (YANAGIMACHI, 1994), um ativador de desidrogenases mitocondriais (MC CORMACK et al., 1990) que pode, por sua vez, aumentar a produção de ATP necessária para hiperativação (HO; SUAREZ, 2003), havendo um estímulo da função mitocondrial.

O uso da Kp na concentração 10^{-6} M, melhorou a integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma. Esse resultado também está relacionado com a indução pela Kp da entrada de Ca^{2+} intracelular nos espermatozoides (PINTO et al., 2012; HSU et al., 2014), mantendo a integridade das membranas plasmática e acrossomal para que possa realizar as ações citadas acima. Além disso, outra teoria seria de que a Kp apresenta capacidade de modular localmente a secreção de GnRH (PINTO et al., 2012; SAAELEDIN et al., 2012; HSU et al., 2014). Esse peptídeo é co-expresso com outros dois peptídeos bioativos no hipotálamo, a neuroquinina B (NKB) e a dinorfina A, chamados de neurônios KNDy (RANCE, 2009; LEHMAN et al., 2010; TENA-SEMPERE, 2010), que atuam na modulação da secreção pulsátil de GnRH e consequente liberação de gonadotrofinas (LEHMAN et al., 2010). Essa co-expressão também está presente em espermatozoides humanos (PINTO et al., 2010). A presença de GnRH, da subunidade GnRH α e de seu receptor já foi demonstrado em diversos tecidos hipotalâmicos além de oviduto, células da granulosa ovariana e espermatozoides (IZUMI et al., 1985; MORALES, 1998; LEE et al., 2000). Segundo Morales (1998), esse hormônio aumenta em 10% a capacidade dos espermatozoides de se ligarem à zona pelúcida, não sendo capaz de posteriormente induzir a reação acrossônica nos

espermatozoides humanos. Assim para que a ligação ocorra, a membrana plasmática e acrossomal devem permanecer íntegras. Essa modulação local também foi relatada por Saadeldin et al. (2012), na qual Kp age como uma agonista ativando localmente seu GnRH α subordinado, aumentando a síntese de LH, agindo na maturação ovocitária *in vitro*.

As variáveis de potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma apresentaram associação positiva quando correlacionadas. A integridade e funcionalidade das estruturas espermáticas são essenciais para que possa ocorrer a fecundação e desenvolvimento embrionário (ÔURA; TOSHIMORI, 1990). A lesão da membrana resulta em perda da fluidez e da capacidade regulatória da concentração dos íons intracelulares, alterando assim a motilidade e o metabolismo (AITKEN; KRAUSZ, 2001; GUERRA et al., 2004). Segundo WATSON et al. (1987), a lesão das membranas na região da cabeça do espermatozoide começa na membrana plasmática por ser mais externa e de forma progressiva atinge o acrossoma, assim a integridade do acrossoma depende da integridade da membrana plasmática.

9 CONCLUSÃO

O uso da Kp no processo *in vitro* de seleção espermática, proporcionou maior viabilidade aos espermatozoides bovinos. A concentração equilibrada da Kp auxiliou no potencial mitocondrial, integridade acrossômica e de membrana plasmática. O antagonista P-234 apresentou efeito prejudicial apenas referente ao potencial mitocondrial.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220497>

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane Structure. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed.: Garland Publishing, New York. Cap. 10, p. 478-506, 1994.

ALBERS-WOLTERS, C. H. J.; DE GIER, J.; WALEN, M.; VAN KOOTEN, P. J. S.; LAMBALK, C. B.; LEEGWATER, P. A. J.; ROELEN, B. A. J.; SCHAEFERS-OKKENS, A. C.; RUTTEN, V. P. M. G.; MILLAR, R. P. M.; KOOISTRA, H. S. *In vitro* and *in vivo* effects of kisspeptin antagonists p234, p271, p354, and p356 on GPR54 activation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179156, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179156>

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea, Febiger. Cap. 80, p. 717-718, 1992.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea, Febiger. Cap. 77, p. 658-688, 1993.

ANJUM, S.; KRISHNA, A.; SRIDARAN, R.; TSUTSUI, K. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 317, n. 10, p. 630-644, 2012. <https://doi.org/10.1002/jez.1765>

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de**

fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).
2000. Tese (Livre Docência) - Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da
integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela
técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 226-227, 2003.

ARRUDA, R. L.; ORROS, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA-SILVA, E. V.; ZÚCARI, C. E.
S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen
congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 168-184,
2010.

ASSUMPÇÃO, M. E.; HAIPECK, O. D.; LIMA, K. A. Capacitação espermática *in vitro*
com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian
Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000300008>

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg.
Australian Journal of Science Research, v. 4, n. 1, p. 581-596, 1951.

<https://doi.org/10.1071/B19510581>

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro*
insemination. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 871-878, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00272-A](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00272-A)

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

BAYYARI, G. R.; COOK, J. R.; HARRIS Jr, G. C.; MACY, L. B.; SLAVICK, M. F.;
SKEELES, J. K. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using a
fluorescent staining in a 96-well format. **Poultry Science**, v. 69, n. 9, p. 1602-1605,
1990. <https://doi.org/10.3382/ps.0691602>

BENOFF, S. Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 3, p. 453-471, 1998. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.5.453>

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54-62, 1995. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>

BRACKETT, R. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 43-64, 1993. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X)

BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1, p. 139-144, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00704-3)

BREITBART, H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Cellular and Molecular Biology**, v. 49, n. 3, p. 321-327, 2003.

BREITBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v. 4, n. 3, p. 151-159, 1999. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040151>

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00481-2)

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2008.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de

embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 23, p. 78-83, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000100012>

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 749-756, 2003. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag093>

CARREIRA, J. T. Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromática e produção de embriões in vitro de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal. 2008. Dissertação (Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, São Paulo.

CASTAÑO, J. P.; MARTÍNEZ-FUENTES, A. J.; GUTIÉRREZ-PASCUAL, E.; VAUDRY, H.; TENA-SEMPERE, M.; MALAGÓN, M. M. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 10–15, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.025>

CASTELLANO, J. M.; GAYTAN, M.; ROA, J.; VIGO, E.; NAVARTO, V. M.; BELLIDO, C.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; PELLICER, A.; PINILLA, L.; GAYTAN, F.; TENA-SEMPERE, M. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852-4862, 2006. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0117>

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 15-90, 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2, p. 119-131, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001>

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in to the fallopian tube. **Nature**, v. 168, n. 1, p. 697-698, 1951. <https://doi.org/10.1038/168697b0>

CHANG, H.; SUAREZ, S. S. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 4, p. 507–513, 2010. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.083113>

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 38, p. 305-311, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x>

CONSTANTIN, S.; CALIGIONI, C. S.; STOJILKOVIC, S.; WRAY, S. Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotrophin-releasing hormone-1 neurons. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1400–1412, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0979>

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' - tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2438>

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0012>

COSTELLO, S.; MICHELANGELI, F.; NASH, K.; LEFIEVRE, L.; MORRIS, J.; MACHADO- OLIVEIRA, G.; BARRATT, C.; KIRKMAN-BROWN, J.; PUBLICOVER, S. Ca²⁺ stores in sperm: their identities and functions. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 425–437, 2009. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0134>

COX, J. F. CAPACITACIÓN ESPERMATICA PARA FERTILIZACIÓN IN VITRO EN RUMIANTES – ASPECTOS BÁSICOS Y APLICADOS IN MANIPULATING THE MAMMALIAN EMBRYO, 1990, São Paulo. *Proceedings... 30º Simpósio em Tópicos Avançados em Reprodução Animal*, FCAVJ-UNESP, p. 27-63, 1990.

CRAN, D. G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. n. 38, p. 49-62, 1989.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p 7-11, 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.7>

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003. <https://doi.org/10.1002/jemt.10312>

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 124, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0122-0>

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. Cap. 13, p. 227-255, 1993.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; NISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p.481–510, 1999. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.481>

DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p. 166-179, 2005.

DE LIMA, A. C. B.; STERZA, F. M. A produção *in vitro* de embriões de genética especializada da raça girolando. **Anais do Semex**, n. 8, 2016.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J. C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy**, v. 100, n. 19, p. 10972-10976, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988. <https://doi.org/10.1002/jez.1402480213>

DUCHEN, M. R.; CROMPTON, M.; PEUCHEN, S.; NOWICKY, A. The use of a carbocyanine dye, JC-1, to monitor changes of mitochondrial potential in isolated mammalian cells. **Journal of Physiology**, v. 473, p. 7, 1993.

DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotrophin releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1154–1158, 2006. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1282>

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. cap. 2, p. 29-77, 1994.

EEZZAT, A.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; GOTO, Y.; NAKAJIMA, Y.; JIN, J.; YAMASHITA, T. K.; SAWAI, HASHIZUME, T. The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 3, p. 267-272, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.06.002>

FARAH, O. I.; CUILING, L.; JIAOJIAO, W.; HUIPING, Z. Use of fluorescent dyes for readily recognizing sperm damage. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 14, n. 3, p. 120-125, 2013.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

<https://doi.org/10.1002/mrd.1080320105>

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Maturação citoplasmática de óocitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 172-181, 2008.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 1469, p. 197-235, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

GABALDI, S. H.; WOLF, A.; ESPER, C. R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 61-65, 2002.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 249-265, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00161-0)

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 371-379, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01530-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01530-8)

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod34.1.127>

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C. H. Fluorimetric evaluation of criopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v. 30, p. 369-378, 1988. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90184-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90184-7)

GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J. M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO, B.; GARRIDO, N.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; MILLAR, R. P.; PELLICER, A.; FRASER, H. M.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 3, p. E520–E531, 2009.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90895.2008>

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento** 5ed. São Paulo: FUNPEC, p. 918, 2003.

GIRAUD, M. N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2160-2164, 2000. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2160>

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, v. 1, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, p.30-65, 1994.

GOTTARDI, F. P., MINGOTI, G. Z.; Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

GOTTSCH, M. L.; CUNNINGHAM, M. J.; SMITH, J. T.; POPA, S. M.; ACOHIDO, B. V.; CROWLEY, W. F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. A role for kisspeptin in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4073-4077, 2004. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0431>

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>

GUEMRA, S.; MONZANI, P. S.; SANTOS, E. S.; ZANIN, R., OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de óocitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600005>

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, E.; MARTÍNWZ-FUENTES, A. J.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M.; MALAGÓN, M.M.; CASTÑO, J. P. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 7, p. 521-530, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01558.x>

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109 , BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p.501–507, 2006. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053306>

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Determination of the quantity of intact spermatozoa in bull ejaculates. **Archive Experimentelle Veterinary Medicin**, v. 38, p. 105-114, 1984.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, n. 11, p.

73-88, 1990.

HAN, S. K.; GOTTSCH, M. L.; LEE, K. J.; POPA, S. M.; SMITH, J. T.; JAKAWICH, S. K.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A.; HERBISON, A. E. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 11349–11356, 2005.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005>

HAUGLAND, R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Oregon, USA: Molecular Probes, 2001.

HERBISON, A. E.; DE TASSIGNY, X.; DORAN, J.; COLLEDGE, W. H. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**. v. 151, n. 1, p. 312-321, 2010.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-0552>

HERNANDEZ-GONZALEZ, E. O.; SOSNIK, J.; EDWARDS, J.; ACEVEDO, J. J.; MENDOZA-LUJAMBIO, I.; LOPÉZ-GONZÁLEZ, I.; DEMARCO, I.; WERTHEIMER, E.; DARSZON, A.; VISCONTI, P. E. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5623–33, 2006.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M508172200>

HIDEN, U.; BILBAN, M.; KNÖFLER, M.; DESOYE, G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 1, p.31–39, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9030-8>

HINTON, B. T.; SETCHELL, B. P. Fluid secretion and movement. In: **The Sertoli cell**. Vienna IL:Cache River Press; 1993.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1590-1596, 2003.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011320>

- HSU, M. C.; WANG, J. Y.; LEE, Y. J.; JONG, D. S.; TSUI, K. H.; CHIU, C. H. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 835-845, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0368>
- HULEIHEL, M; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, n. 3, p. 259-268, 2004
- IRITANI, A.; NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, n. 1, p. 119-121, 1977. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0500119>
- IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 4, p. 264–272, 2004. <https://doi.org/10.1159/000083140>
- IZUMI, S. I.; MAKINO, T.; IIZUKA, R. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the seminal plasma and human semen parameters. **Fertility and Sterility**, v. 43, n. 4, p. 617–620, 1985. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)48506-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)48506-7)
- JAYASENA, C. N.; NIJHER, G. M. K.; ABBARA, A.; MURPHY, K. G.; LIM, A.; PATEL, D.; MEHTA, A.; TODD, C.; DONALDSON, M.; TREW, G. H.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R.; DHILLO, W. S. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 6, p. 840–847, 2010. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.204>
- JAYASENA, C. N.; ABBARA, A.; COMNINOS, A. N.; NIJHER, G. M.; CHRISTOPOULOS, G.; NARAYANASWAMY, S.; IZZI-ENGBEAYA, C.; SRIDHARAN, M.; MASON, A. J.; WARWICK, J.; ASHBY, D.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R.; CARBY, A.; TREW, G. H.; DHILLO, W. S. Kisspeptin-54 triggers egg

maturity in women undergoing in vitro fertilization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 8, p. 3667–3677, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI75730>

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 471-480, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00108-1)

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3ed. United of America: Elsevier, p. 3191, 2006.

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins , the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34631–34636, 2001.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104847200>

KRETSER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D; WREFORD, N. Spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 13, n. suppl_1, p. 1-8, 1998.

KROLL, H.; BOLSOVER, S.; HSU, J.; KIM, S. H.; BOULOUX, P. M. Kisspeptin-evoked calciumsignals in isolated primary rat gonadotrophinreleasing hormone neurons. **Neuroendocrinology**, v. 93, p. 114–120, 2011. <https://doi.org/10.1159/000321678>

KUDRYAVTSEV, I. V.; SAFRONOVA, L. D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.
<https://doi.org/10.1023/B:RUDO.0000007888.44166.cb>

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique. **American Journal of Anatomy**, v. 90, n. 2, p. 167–206, 1952. <https://doi.org/10.1002/aja.1000900202>

LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K.; TRENT, J. M.; WEISSMAN, B. E.; WELCH, D. R. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–7, 1996. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.23.1731>

LEE, C. Y. G.; HO, J.; CHOW, S. N.; YASOJIMA, K.; SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Immunoidentification of gonadotropin releasing hormone receptor in human sperm, pituitary and cancer cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 44, n. 3, p. 170–177, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2000.440307.x>

LEHMAN, M. N.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Minireview: kisspeptina/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3479–3489, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0022>

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76–86, 1979. <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>

LEITE, T. G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

LIU, P. Y.; HANDELSMAN, D. J. The present and the future state of hormonal treatment for male infertility. **Human reproduction Update**, v. 9, n. 1, p. 9–23, 2003. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg002>

LIU, X.; LEE, K.; HERBISON, A. E. Kisspeptin excites gonadotrophin releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4605–4614, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0321>

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced bovine embryos dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17–22, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>

MACEDO, G. G.; MAIO, J. R. G.; MONTEIRO, B. M.; BATISTA, E. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SOARES, J. G.; SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, G. M.; MENDANHA, M. F.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Kisspeptin stimulates LH release, is enhanced by estradiol and induces ovulation in bovine females. In: 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2013, Praia do Forte. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 29th to September 1s. Uberlândia: CBRA, 2013. v. 1, p. 411-411.

MAPLETOFT, R. J. History and perspectives on bovine embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 168-173, 2013.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 121-133, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>

MASON, A. O.; GREIVES, T. J.; SCOTTI, M. A. L.; LEVINE, J.; FROMMEYER, S.; KETTERSON, E. D.; DEMAS, G. E.; KRIEGSFELD, L. J. Suppression of kisspeptin expression and gonadotropin axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 492-498, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.07.004>

MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; KUMANO, S.; MATSUMOTO, H.; OHTAKI, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotrophin release and ovulation in the rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 383–388, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.185>

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or

absence of seminal plasma. **Reproduction of Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997. <https://doi.org/10.1071/RD9961165>

MC CORMACK, J. G.; HALESTRAP, A. P.; DENTON, R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intra mitochondrial metabolism. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 391–425, 1990. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.391>

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; DE SOUSA, S. L. G.; DE MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. J. R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1761 – 1766, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409330102>

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 42, n. 5-6, p. 899-915, 1990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.6.899>

MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 361-369, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01537-0](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01537-0)

MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução**, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005.

MORALES, P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2, p. 426–430, 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.2.426>

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n.5, p. 403-439, 1997. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>

MORTIMER, S. T. CASA: Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p.515–524, 2000.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1291-1301, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00483-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00483-6)

NASSAR, A.; MAHONY, M.; MORSCHEDI, M.; LIN, M. H.; SRISONBUT, C.; OEHMINGER, S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 7, p. 919-923, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00013-8)

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; BARREIRO, M. L.; ROA, J.; SANCHEZ-CRIADO, J. E. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4565–4574, 2004. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0413>

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; PINILLA, C. D. L.; TENA-SEMPERE, M. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1689–1697, 2005a. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1353>

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; NOGUEIRAS, R.; VAZQUEZ, M. J.; BARREIRO, M. L.; MAGNI, P.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 156–163, 2005b. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0836>

OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin Signaling in the Brain. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 713–743, 2009. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0005>

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, 2001. <https://doi.org/10.1038/35079135>

OKAMURA, H.; YAMAMURA, T.; WAKABAYASHI, Y. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 5, p. 369–381, 2013. <https://doi.org/10.1111/asj.12056>

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A; STUMPP, T. Biologia epididimaria: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.

ŌURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61207-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61207-3)

O'DONNEL, L; ROBERTSON, K. M.; JONES M. E.; SIMPSON E. R. Estrogen and Spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001. <https://doi.org/10.1210/er.22.3.289>

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKOPARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOVANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of the Cell**, v. 92, n. 3-4, p. 255-266, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)

PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARE, H. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 47, n. 2, p. 549-558, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00013-7)

PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 485-488, 1974. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410485>

PINEDA, R.; GARCIA-GALIANO, D.; ROSEWEIR, A.; ROMERO, M.; SANCHEZ-GARRIDO, M. A.; RUIZ-PINO, F.; MORGAN, K.; PINILLA, L.; MILLAR, R. P.; TENA-SEMPERE, M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 722-730, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0803>

PINILLA L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MILLAR, R.P.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3 p. 1235-1316, 2012. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010>

PINTO, F. M.; RAVINA, C. G.; SUBIRAN, N.; CEJUDO-ROMÁN, A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M.; IRAZUSTA, J.; GARRIDO, N.; CANDENAS, L. Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 104, 2010. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-104>

PINTO, F. M.; CEJUDO-ROMAN, A.; RAVINA, C. G.; FERNANDEZ-SANCHEZ, M.; MARTIN- LOZANO, D.; ILLANES, M.; TENA-SEMPERE, M.; CANDENAS, M. L. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 1, p. 63–73, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01177.x>

PUKAZHENTHI, B. S; WILDT, D. E; OTTINGER, M. A; HOWARD, J. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. **Molecular Reproduction Development**. v. 49, n. 1, p. 48-57, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199801\)49:1<48::AID-MRD6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<48::AID-MRD6>3.0.CO;2-0)

RANCE, N. E. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 111–122, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.016>

REDMOND, J. S.; MACEDO, G. G.; VELEZ, I. C.; CARATY, A.; WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M. Kisspeptin activates the hypothalamic–adeno hypophyseal–gonadal axis in pre pubertal ewe lambs. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 541-548, 2011. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0467>

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480-4486, 1991. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New *frontiers* in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 48–69, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.07.002>

ROLDAN, E. R.; MURASE, T.; SHI, Q. X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1578–1581, 1994.
<https://doi.org/10.1126/science.7985030>

ROSEWEIR, A. K.; MILLAR, R. P. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 203-212, 2009.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmn058>

ROSEWEIR, A. K.; KAUFFMAN, A. S.; SMITH, J. T.; GUERRIERO, K. A.; MORGAN, K.; PILECKA-FORTUNA, J.; PINEDA, R.; GOTTSCH, M. L.; TENA-SEMPERE, M.; MOENTER, S. M.; TERASAWA, E.; CLARKE, I. J.; STEINER, R. A.; MILLAR, R. P. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3920–3929, 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009>

ROSEWEIR, A. K.; KATZ, A. A.; MILLAR, R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. **Placenta**, v. 33, p. 408–415, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.02.001>

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, p. 284, 1990.

SAADELDIN, I. M.; KOO, O. J.; KANG, J. T.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; KIM, S.; PARK, S. J.; KIM, S. J.; MOON, J. H.; HYUN, J. O.; JANG, G.; LEE, B. C. Paradoxical effects of kisspeptin: It enhances oocyte *in vitro* maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during *in vitro* culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 656-668, 2012. <https://doi.org/10.1071/RD11118>

SALEHI, S.; ADESHINA, I.; CHEN, H.; ZIRKIN, B. R.; HUSSAIN, M. A.; WONDISFORD, F.; WOLFE, A.; RADOVICK, S. Developmental and endocrine regulation of Kisspeptin expression in mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1514-1522, 2015. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1606>

SALICIONI, A. M.; PLATT, M. D.; WERTHEIMER, E. V.; ARCELAY, E.; ALLAIRE, A.; SOSNIK, J.; VISCONTI, P. E. Signalling pathways involved in sperm capacitation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 245, 2007.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 89-100, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00116-2)

SEMINARA, S. B.; MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERTNO, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 2003.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>

SEMINARA, S. B.; DIPIETRO, M. J.; RAMASWAMY, S.; CROWLEY, W. F.; PLANT, T. M. Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2122–2126, 2006.

<https://doi.org/10.1210/en.2005-1550>

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; DE OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1, p. 37- 43, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00113-0)

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 2, p. 497-513, 1998.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.497>

SHIDU, K. S.; GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **International Review Cytology**, v.118, p.231-280, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60876-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60876-1)

SILVA, C.; CALEGARI, R. S.; MARTINS JUNIOR, A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação *in vitro* de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 89-100, 2009.

SMITH, J. T.; POPA, S. M.; CLIFTON, D. K.; HOFFMAN, G. E.; STEINER RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinising hormone surge. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 25, p.6687–6694, 2006. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006>

SMITH, J. T.; RAO, A.; PEREIRA, A.; CARATY, A.; MILLAR, R. P.; CLARKE, I. J. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin *in vivo*. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 149:1951, 2008.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. **Dukes – fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A. Cap. 35, p. 603-614, 1996.

STITZEL, M. L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote-transition. **Science**, v. 316, n. 5823, p. 407-408, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1138236>

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998.

SUZUKI, S.; KADOKAWA, H.; HASHIZUME, T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3, p. 360–365, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.016>

TENA-SEMPERE, M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic- gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset. **Endocrine Development**, v. 17, p. 52–62, 2010. <https://doi.org/10.1159/000262528>

TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; HATTORI, M.; NISHIMURA, A.; OHTAKI, T.; SHINTANI, Y. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v.1678, n. 2, p. 102–110, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.bbexp.2004.02.005>

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcoline-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1372-1379, 1995.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod52.6.1372>

THOMPSON, E. L.; PATTERSON, M.; MURPHY, K. G.; SMITH, K. L.; DHILLO, W. S.; TODD, J. F.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Central and peripheral administration of Kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 10, p. 850–858, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01240.x>

TULSIANI, D. R.; SKUDLAREK, M. D.; HOLLAND, M. K.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2; p. 417-428, 1993. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.2.417>

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-51, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>

VARNER, D. D. Developments in stallion sêmen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.023>

VISCONTI, P. E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 667–668, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811895106>

WANG, W.; DAY, B. N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 335-341, 2003.
<https://doi.org/10.1002/jemt.10346>

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1506–1514, 1998.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1506>

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M.; ALLEN, W. E. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **Journal of Reproductive and Fertility**, Suppl, v. 35, p.651-653, 1987.

YANAGIMACHI, R., Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal Reproduction and Fertility**, Suppl. v. 38, p. 27-33, 1989.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 1, p. 94-100, 1993. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080340115>

ZHAO, S.; ZHU, E.; YANG, C.; BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K.; KRIEGSFELD, L. J. RF amide-related peptide and messenger ribonucleic acid expression in mammalian testis: association with the spermatogenic cycle. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 617–627, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0978>