



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



VITORIA CRISTINA BERNARDELLI

COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE REOTAXIA EM ESPERMATOZOIDES
BOVINOS HIPERATIVADOS E NÃO HIPERATIVADOS, EM AMBIENTE SIMULADO
DE TUBA UTERINA.

UBERLÂNDIA

2022

VITORIA CRISTINA BERNARDELLI

COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE REOTAXIA EM ESPERMATOZOIDES
BOVINOS HIPERATIVADOS E NÃO HIPERATIVADOS, EM AMBIENTE SIMULADO
DE TUBA UTERINA.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina na Universidade Federal
de Uberlândia.

Orientador: Profº Drº Marcelo
Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2022

COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE REOTAXIA EM ESPERMATOZOIDES
BOVINOS HIPERATIVADOS E NÃO HIPERATIVADOS, EM AMBIENTE SIMULADO
DE TUBA UTERINA.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina na Universidade Federal
de Uberlândia.

Uberlândia, 11 de agosto de 2022.

Banca examinadora formada por:

Profº Drº Marcelo Emílio Beletti

Profº Drº Bruno Augusto Nassif Travençolo

Profº Me. Marcos Paulo Oliveira Almeida

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por desde sempre, acreditarem, estimularem e fornecerem suporte aos meus sonhos

Agradeço aos meus dois portos seguros, João e Luan, por sempre me desafiarem a tentar alcançar voos cada vez mais altos e também serem a segurança de ter para onde voltar

Agradeço meus amigos, por me darem todo suporte possível, sempre vibrando comigo a cada conquista

Agradeço a todos meus colegas do Laboratório de Pesquisa de Biologia da Reprodução, que ajudaram nos primeiros passos da minha carreira e são suporte contínuo de conhecimento

Agradeço as embriologistas, minhas colegas de trabalho, do Laboratório de Reprodução Humana da CEFERP, que me acolheram de braços abertos, além de transmitirem seus conhecimentos com muito carinho

E agradeço também ao meu orientador, Profº Marcelo, que acreditou no meu potencial e me orientou com toda a paciência do mundo.

COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE REOTAXIA EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS HIPERATIVADOS E NÃO HIPERATIVADOS, EM AMBIENTE SIMULADO DE TUBA UTERINA.

1. RESUMO

A reotaxia positiva é o mecanismo que orienta o espermatozoide por uma longa distância contra o fluxo de fluido do trato genital feminino. A capacitação espermática é a maturação que ocorre no espermatozoide durante seu trajeto no trato genital feminino para que ele seja capaz de fecundar o ovócito, e a hiperativação é uma das etapas consideradas mais importantes. Ambos os fenômenos estão associados a seleção de espermatozoides de melhor qualidade. O objetivo deste estudo foi avaliar qual a influência da hiperativação na reotaxia espermática de bovinos. Os dados foram coletados através de análise de vídeo no *software* ImageJ FIJI. A avaliação foi feita pela análise estatística do movimento dos espermatozoides hiperativado de touro em meio suplementado com heparina em comparação com movimento dos espermatozoides em meio não suplementado, em ambiente simulado de tuba uterina com e sem fluxo. Os resultados demonstraram que os espermatozoides não hiperativados e os hiperativados com comportamento reotático tem uma velocidade média de natação maior do que os espermatozoides que nadam aleatoriamente em ambiente estático ($p < 0,0001$). Foi averiguado uma diminuição da velocidade média de natação ($p < 0,0001$) e um aumento na angulação da trajetória em relação ao fluxo ($p < 0,045$) dos espermatozoides hiperativados. Concluiu-se que a hiperativação altera a reotaxia dos espermatozoides, e que esse fenômeno pode ser um facilitador para o espermatozoide encontrar o ovócito no momento ideal para a fecundação.

Palavras-chave: Espermatozoide. Capacitação espermática. Transporte espermático.

2. INTRODUÇÃO

O primeiro protocolo consistente de fertilização *in vitro* (FIV) de ovócito de mamífero foi em coelho há mais de 60 anos (Chang 1959). Depois disso, houve um complexo avanço nas técnicas e no conhecimento sobre os processos biológicos que influenciam a fertilização e o êxito de uma gestação, porém as taxas de sucesso da FIV em bovinos ainda são de apenas 30-40% (Lonergan *et al.* 2001; Dyer *et al.* 2016). Uma das tentativas de aumentar essas taxas é selecionar gametas de melhor qualidade através da mimetização dos processos naturais a que são expostos, o que gera a necessidade de detalhar os mecanismos envolvidos no transporte do espermatozoide do local em que é depositado no trato reprodutivo feminino até o encontro com o ovócito no local de fertilização (Bettera Marcat *et al.* 2020; Giojalas e Guidobaldi 2020). A localização da deposição do sêmen depende da espécie, porém, os espermatozoides de mamíferos sempre enfrentam um fluxo retrógrado ao seu destino, causado pela contratilidade do ambiente uterino sob a influência do estrogênio que estimula a secreção de muco que flui em direção ao colo do útero (Miki e Clapham 2013; El-Sherry *et al.* 2014). Ao chegar na tuba uterina, os espermatozoides nadam do istmo passando pela junção istmo-ampola para encontrar a superfície do ovócito na ampola. Somente sua própria motilidade não é suficiente para cumprir o caminho de mais de 1000 vezes seu comprimento, em humanos, até alcançar a superfície do ovócito (Kantsler *et al.* 2014; Romero-Aguirregomez *et al.* 2018; Zaferani *et al.* 2018). Obviamente, esse comprimento é muito maior em bovinos. A complexidade e o sucesso dessa jornada são dados pela interação da

fisiologia e arquitetura da tuba uterina, com os mecanismos de orientação do espermatozoide (quimiotaxia, reotaxia, termotaxia e tigmotaxia) e interações moleculares ligante-receptor de fatores femininos com o espermatozoide (Giojalas e Guidobaldi 2020). Uma parte desses fenômenos estão caracterizados individualmente, mas ainda é preciso muita pesquisa para compreender a correlação entre os múltiplos mecanismos e o ajuste molecular que regula a jornada do espermatozoide até o ovócito (Wang e Larina 2018; Hyakutake *et al.* 2021).

A infertilidade masculina tem como principal causa a baixa motilidade espermática (Zaferani *et al.* 2018). A reotaxia positiva é a capacidade de uma célula ou organismo de orientar seu movimento contra um gradiente de fluxo de fluido. Esse é o principal mecanismo de guia dos espermatozoides por longas distâncias em direção ao local de fertilização no trato reprodutivo feminino de mamíferos (Denissenko *et al.* 2012; Miki e Clapham 2013; Romero-Aguirregomezcorta *et al.* 2018; Xu *et al.* 2020; Hyakutake *et al.* 2021). Há mais de 100 anos o comportamento reotático foi demonstrado em espermatozoides e, até o momento, já foi caracterizado em humanos, touros, camundongos, garanhões e javalis (Kantsler *et al.* 2014; Tung *et al.* 2014; Romero-Aguirregomezcorta *et al.* 2018; Fair e Romero-Aguirregomezcorta, 2019; Giojalas e Guidobaldi 2020). Há relatos que os espermatozoides de humano e de touro nadam contra fluxo em trajetórias em forma de espiral e que tem a capacidade de reverter sua direção de natação na reversão do fluxo (Kantsler *et al.* 2014). Espermatozoides capacitados e não capacitados, imersos em meios de baixa e alta viscosidade apresentam essa resposta comportamental inata dependente da atividade de canais de cálcio do espermatozoide (CatSper) (Nair 2020).

O sêmen ejaculado não é capaz de fecundar o ovócito sem passar pelas mudanças bioquímicas, na forma de capacitação, que ocorrem durante seu longo caminho pelo trato genital feminino. Uma das partes da capacitação é a hiperativação, caracterizada por um padrão de movimento frenético em forma de oito quando visto microscopicamente sob uma lâmina em meio aquoso, o que auxiliaria os espermatozoides nadarem contra o fluido oviductal viscoso, facilitaria no desprendimento do espermatozoide da parede do oviduto e na penetração através das células do *cumulus* que cercam o ovócito (Loux *et al.* 2013). Em 1988, a heparina foi descoberta como uma molécula capacitadora e, desde então, é amplamente utilizada para hiperativação de espermatozoides *in vitro* (Parrish *et al.* 1988). Sua forma de ação é se ligar às proteínas do plasma seminal bovino (BSPs) presentes nos espermatozoides que interagem com o colesterol e os fosfolipídios na membrana plasmática. Após a ligação, há uma perda progressiva das BSPs que leva à perda de colesterol e fosfolipídios da membrana. Enquanto isto ocorre, também acontecem alterações no pH intracelular do esperma, nos níveis intracelulares de Ca^{2+} e de adenosina 3'5' monofosfato cíclico (cAMP) (Parrish 2014).

A reotaxia dos espermatozoides já foi caracterizada em diversas espécies (Kantsler *et al.* 2014; Tung *et al.* 2014; Romero-Aguirregomezcorta *et al.* 2018; Fair e Romero-Aguirregomezcorta, 2019), também é utilizada no processamento seminal para melhorar a qualidade do esperma obtido (Romero-Aguirregomezcorta *et al.* 2021), e, aparenta ser um mecanismo de transporte e orientação promissor no desenvolvimento biotecnológico para dispositivos de entrega direcionada de fármacos em ambientes biológicos complexos (Xu *et al.* 2020). Apesar de existirem trabalhos em diversas vertentes que estudam a resposta reotática, pouco se sabe sobre qual a influência da hiperativação na reotaxia espermática de bovinos. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações no comportamento de reotaxia dos espermatozoides bovinos hiperativados por heparina quando comparados aos não hiperativados, em ambiente simulado de tuba uterina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de sêmen

Foram utilizadas amostras congeladas de uma partida de sêmen de touro Nelore (Panagpur Al Paul – lote G-1000 – abril/2012) adquirida em central de processamento de sêmen, o que dispensa a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Essa partida já havia sido testada no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia e demonstrou bons resultados na produção *in vitro* de embriões.

3.2. Meios de diluição

O meio modificado de lactato de albumina piruvato de Tyrode (TALP) foi usado em todos os experimentos e foi preparado antes do uso. Tinha como base a seguinte composição: NaCl (114mM/100mM), KCl (3mM/3mM), CaCl₂ (2,00mM), MgCl₂·6H₂O (0,5mM/0,4mM), NaH₂PO₄-Anidro (0,3mM), NaHCO₃ (25mM), DL-Ácido Lático (60%) (12mM/26mM), *Phenol Red* (30μM), Água Milli-Q, amicacina (17 mg/mL) e piruvato sódico (11 μg/mL). Para avaliar os espermatozoides em condição não hiperativados foi utilizada o meio *Sperm*-TALP sem suplementação com heparina (base descrita acima com adicional de Hepes Ácido (10mM) e para induzir a hiperativação espermática foi utilizada a suplementação com 10 μg/mL de heparina no meio *Fert*-TALP (base descrita acima com adicional de Albumina Sérica Bovina, DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM), DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM), bisulfito de sódio, hipotaurina, salina 0,9% e epinefrina). O meio foi esterilizado por passagem através de um filtro Millipore Millex-GV 0,22-μm (Millipore Corp., Bedford, MA) e equilibrado a 38°C sob 5% de CO₂. O valor de pH do meio foi de 7,4 quando equilibrado com gás CO₂. As amostras de sêmen bovino descongelado foram diluídas 1:5 (v/v) em meio *Sperm*-TALP ou *Fert*-TALP.

3.3. Condições ambientais avaliadas

As seguintes condições ambientais foram avaliadas: espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo, espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo, espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo, e, espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo.

3.4. Ambiente simulado de tuba uterina

Uma câmara de fluxo (Figura 1) foi construída de vidro e silicone com as seguintes dimensões: 32mm x 3 mm x 0,2 mm (comprimento x largura x altura). A base foi uma lâmina de vidro de microscopia comum, as laterais foram duas metades de uma lamínula (24mm x 32mm) fixadas com silicone sobre a lâmina e mantendo centralmente uma distância de 3 mm. Sobre este conjunto foi colado, também com silicone, uma lamínula inteira (24mm x 32mm). Considerando que a lamínula tem 0,17 mm de altura e que a camada de silicone foi de aproximadamente 0,02 mm, obteve-se um túnel de perfil retangular. Em cada experimento a amostra de sêmen diluída em meio TALP foi colocada na câmara de fluxo até que fosse totalmente preenchida. Para controle de fluxo, um fragmento de papel de filtro (20mm x 30 mm) umidificado com o mesmo meio da amostra testada (*Sperm*-TALP ou *Fert*-TALP) foi colocado em cada extremidade da câmara. Após a total estabilização da mistura no interior da câmara, o fluxo foi gerado com o gotejamento do meio nas extremidades do papel.

Durante a execução do experimento as amostras foram mantidas em banho maria a 38,0°C e as câmaras de fluxo sobre uma placa aquecedora a 36,5°C. O uso de cada câmara de fluxo foi único, sendo trocada a cada experimento ou nova amostra de sêmen avaliada.

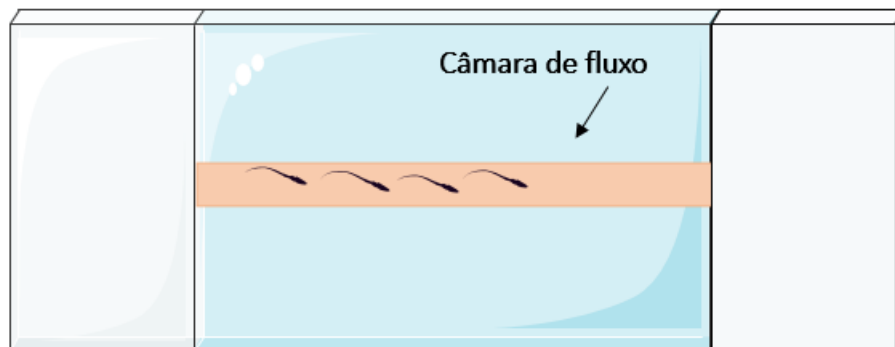


Figura 1 – Ilustração da câmara de fluxo utilizada para simular ambiente de tuba uterina. (Próprio autor)

3.5. Aquisição de imagem de esperma

O comportamento do espermatozoide foi registrado em um microscópio Leica DM500 acoplado a um sistema de captura de imagens Leica ICC50, com a objetiva de 10x. As imagens foram adquiridas em formato AVI e armazenadas para posterior processamento e análise quantitativa.

3.6. Análise de movimento

Para processamento das imagens foi utilizado o *software* ImageJ FIJI (versão 1.53q). Utilizando o *plugin* Manual Tracking, as trajetórias dos espermatozoides foram traçadas quadro a quadro de forma manual, com um operador humano marcando a posição do espermatozoide no eixo X/Y em cada frame da gravação (Figura 2). Os dados gerados foram processados por um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Matlab. Em ambiente com fluxo, apenas os espermatozoides que apresentaram reotaxia foram considerados. E em o ambiente sem fluxo, foram analisados os espermatozoides móveis progressivos.

A velocidade do fluxo, $\vec{v}_F$, foi estimada seguindo as trajetórias das partículas (debris celulares, espermatozoides mortos) no mesmo nível focal dos espermatozoides. Para maior precisão, esta velocidade foi estimada para várias partículas ao longo da mesma sequência de vídeo, a fim de obter um campo vetorial interpolado $\vec{v}_F(d)$, definido em termos da distância d à parede da câmara de fluxo. A velocidade de cada espermatozoide, $\vec{v}_S$, foi estimada seguindo o centro de massa da respectiva imagem da cabeça do espermatozoide. As duas velocidades absolutas $\vec{v}_F$ e $\vec{v}_S$, foram computadas considerando os quadros subsequentes calculando a derivada de primeira ordem referente ao deslocamento do espermatozoide em relação ao tempo. A velocidade relativa do espermatozoide foi então obtida por $\vec{v}_R = \vec{v}_S + \vec{v}_F(d)$ com d sendo a distância do espermatozoide específico à parede da câmara de fluxo. Todas as velocidades foram mensuradas em número de micrometros que cada estrutura percorria em um segundo (μ/s).

O comportamento de cada espermatozoide em diferentes condições de fluxo foi caracterizado estatisticamente (média e desvio padrão) em termos da magnitude e orientação de sua velocidade relativa. Essa avaliação foi realizada em relação aos espermatozoides mais próximos à superfície, pois permaneceram por mais tempo no mesmo plano focal, permitindo um tratamento bidimensional.

As seguintes variáveis foram observadas em 100 trajetórias de espermatozoides por condição ambiental testada: (1) velocidade média da trajetória dos espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo, (2) velocidade média da trajetória dos espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo, (3) velocidade média da trajetória dos espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo, (4) velocidade média da trajetória dos espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo, (5) ângulo médio da trajetória dos espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo e (6) ângulo médio da trajetória dos espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo.

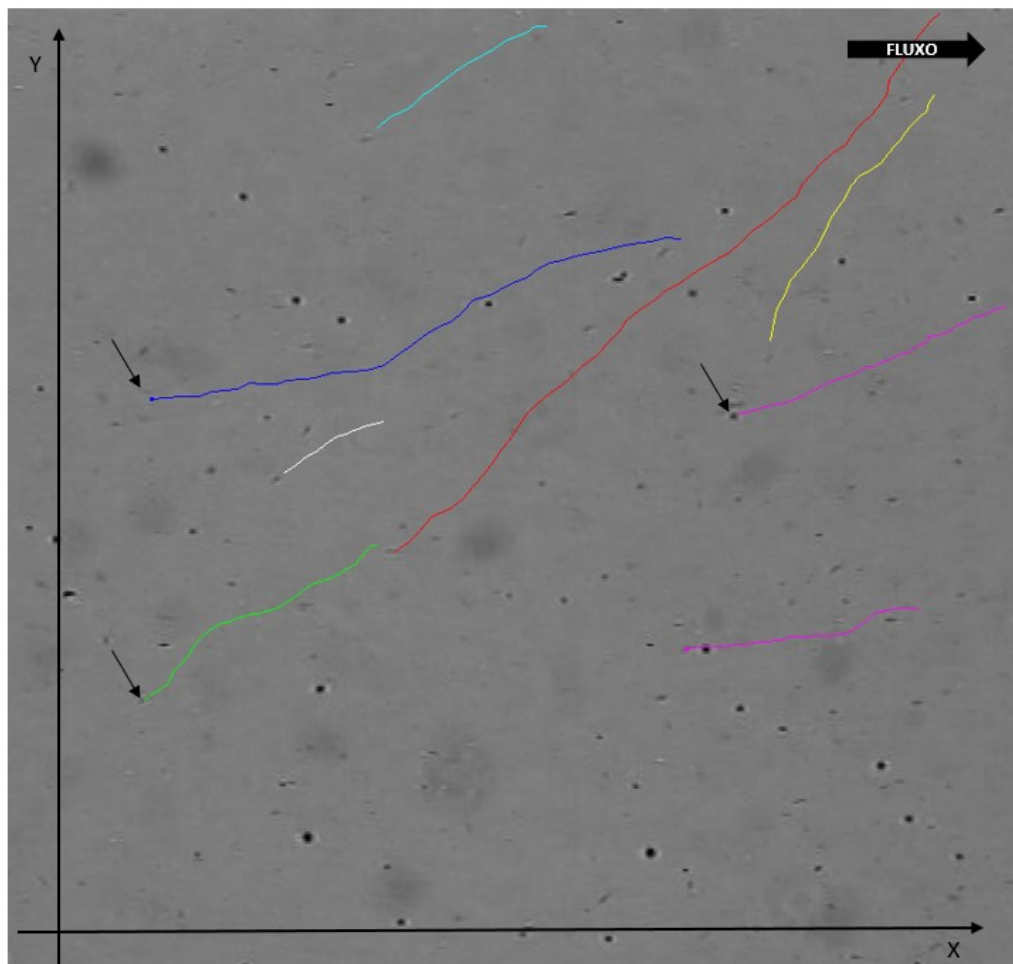


Figura 2 – Quadro de um vídeo analisado no ImageJ FIJI. Linhas coloridas são a trajetória dos espermatozoides que foram traçadas usando o *plugin* Manual Tracking. Setas finas indicam os espermatozoides. Seta grossa indica o sentido do fluxo.

3.7. Análise estatística

Utilizando o *software* PRISMA 8.01 foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição dos dados, com $p < 0,05$, comprovando-se que a distribuição era normal. As possíveis diferenças entre as condições foram verificadas utilizando-se o teste t de Student não pareado bicaudado, considerando como nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados demonstraram que a velocidade média dos espermatozoides não hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo foi de $65,57 \mu/s$ e que a velocidade média dos que nadaram contra fluxo foi de $124,4 \mu/s$, demonstrando ($p < 0,0001$) que os espermatozoides não hiperativados aumentam a velocidade média de natação quando em comportamento reotático (Figura 3 - A). A velocidade média encontrada para espermatozoides hiperativados em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo foi de $62,70 \mu/s$, e para os que nadaram contra fluxo foi de $83,30 \mu/s$. O comportamento foi semelhante ao não hiperativado, ou seja, os espermatozoides com reotaxia aumentaram a velocidade média de natação ($p < 0,0001$) (Figura 3 - B).

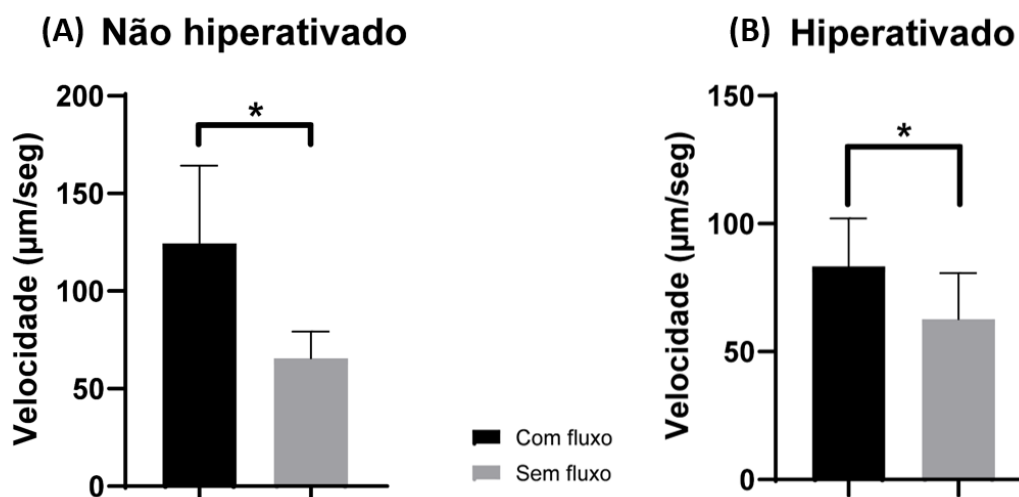


Figura 3 – Comparação entre velocidade média de trajetória dos espermatozoides em ambiente sem fluxo e com fluxo. (A) Velocidade média dos espermatozoides não hiperativados (B) Velocidade média dos espermatozoides hiperativados.

Ao comparar a velocidade média dos espermatozoides não hiperativados ($65,57 \mu/s$) com a velocidade média dos espermatozoides hiperativados ($62,70 \mu/s$) em ambiente simulado de tuba uterina sem fluxo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2120$) (Figura 4). Portanto, a hiperativação não alterou a velocidade dos espermatozoides que nadavam aleatoriamente em ambiente sem fluxo. Foi avaliado a trajetória dos espermatozoides que apresentaram reotaxia positiva em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo, ou seja, nadavam contrários ao sentido do fluxo. Ao comparar a velocidade média ($124,4 \mu/s$) das trajetórias dos espermatozoides não hiperativado com a da velocidade média ($83,30 \mu/s$) dos espermatozoides hiperativados foi encontrada diferença significativa ($p < 0,0001$). Também foram confrontados o ângulo médio ($38,10^\circ$) das trajetórias dos espermatozoides não hiperativado com o ângulo médio ($43,22^\circ$) dos espermatozoides hiperativados e foi encontrada diferença significativa ($p < 0,045$). Ficou evidenciada uma diminuição da velocidade média de natação (Figura 5 - A) e um aumento na angulação da

trajetória em relação ao fluxo (Figura 5 - B) dos espermatozoides hiperativados, confirmando que a hiperativação altera a reotaxia dos espermatozoides.

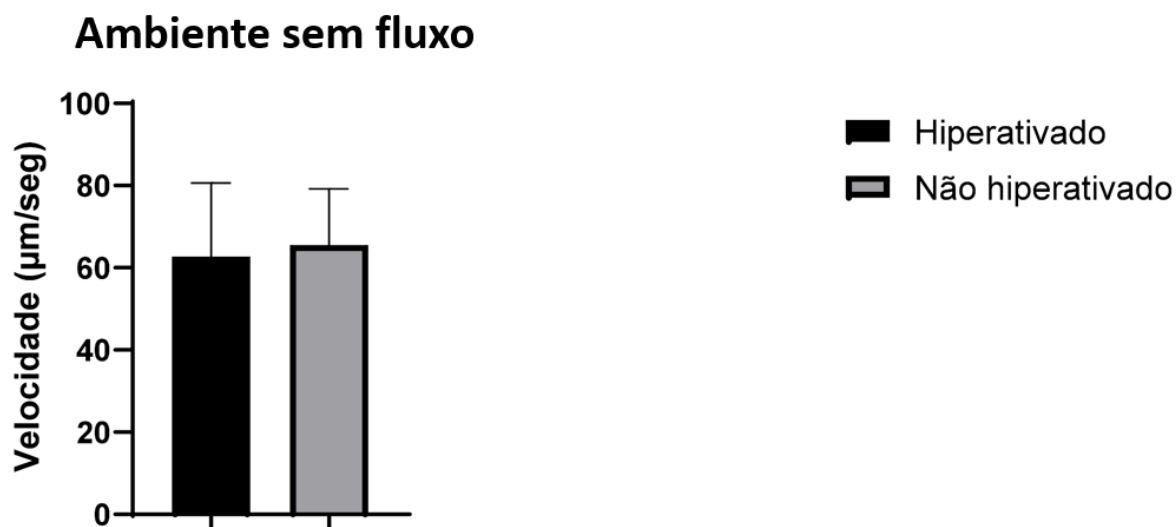
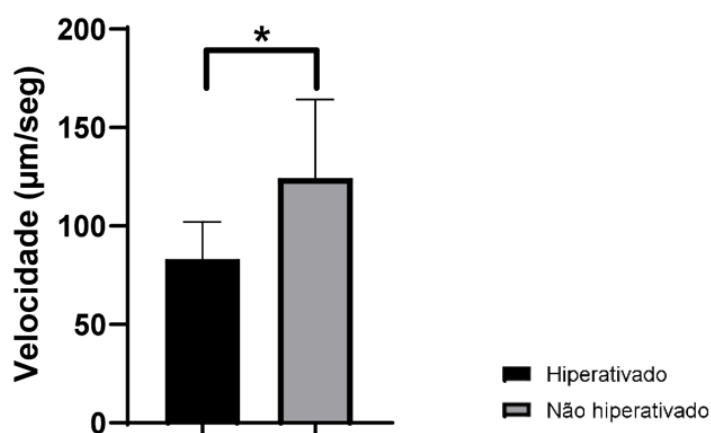


Figura 4 - Comparação entre velocidade média de trajetória dos espermatozoides hiperativados com os não hiperativados em ambiente sem fluxo.

(A) Ambiente com fluxo



(B) Ângulo contra fluxo

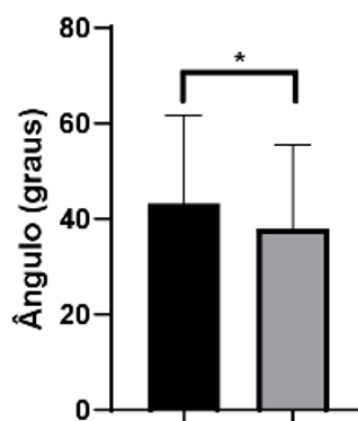


Figura 5 – Comparação dos parâmetros da trajetória dos espermatozoides hiperativados com os não hiperativados, que apresentaram reotaxia positiva em ambiente simulado de tuba uterina com fluxo. (A) Comparação da velocidade média de natação (B) Comparação do ângulo médio de natação em relação a angulação do fluxo.

5. DISCUSSÃO

Para chegar até o local da fertilização nos ovidutos, os espermatozoides se orientam e nadam contra um fluxo de muco, comportamento conhecido como reotaxia positiva. Esse fenômeno foi demonstrado em várias espécies. El-Sherry *et al.* (2014) relataram uma resposta reotática em 80-84% dos espermatozoides de touro e existem diversas evidências sugerindo que a reotaxia é um fator importante na orientação dos espermatozoides bovinos em longa distância. Já foi discutido que em touros, após a hiperativação há uma maior progressão de espermatozoides (Johnson *et al.* 2017). No entanto, ainda não havia sido investigado quais alterações a hiperativação causa no comportamento de reotaxia dos espermatozoides bovinos em ambiente simulado de tuba uterina. Até onde sabemos este é o primeiro estudo

que avalia a influência da hiperativação na velocidade média de natação e angulação da trajetória de espermatozoides bovinos que apresentam reotaxia.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a resposta reotática aumenta a velocidade de natação do espermatozoide bovino não hiperativado e do hiperativado, estando de acordo com o padrão reotático dos espermatozoides já caracterizado por aumento da velocidade (Rappa *et al.* 2018), rotação da cauda e comportamento hiperativado (Miki e Clapham 2013). O espermatozoide tem que percorrer uma longa distância no trato genital feminino, e, portanto, essa característica de aumento de velocidade seria importante para que ele consiga vencer o fluxo tubário e subir ao encontro do ovócito, sem perder o momento ideal de fecundação.

Este estudo demonstrou que a trajetória dos espermatozoides reotáticos, antes mesmo da capacitação, tem angulação lateral em relação a trajetória do fluxo, o que causaria o encontro do espermatozoide com o limite do seu ambiente, no caso, a parede da tuba uterina e nadasse em contato com ela. As mudanças bioquímicas que ocorrem com espermatozoide durante a capacitação, acontecem pela interação deste com a parede do útero/tuba uterina, o que seria facilitado pelo deslocamento lateral demonstrado nesse estudo (Suarez *et al.* 2006). Estudos recentes demonstraram que a reotaxia pode ser usada para selecionar uma população de espermatozoides de baixa fragmentação de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) com alta motilidade, morfologia e viabilidade, levando a melhores taxas de desenvolvimento embrionário (De Martin *et al.* 2017; Nagata *et al.* 2018; Zaferani *et al.* 2018; Romero-Aguirregomezcorra *et al.* 2021). O deslocamento lateral além de facilitar a capacitação poderia também contribuir para a seleção espermática *in vivo*.

A capacitação espermática que ocorre ao longo do trato genital feminino, é definida como a maturação do espermatozoide para que ele seja capaz de fecundar o ovócito e a hiperativação é uma das etapas consideradas mais importantes. A hiperativação é proposta como um comportamento que proporciona o espermatozoide se desprender do revestimento epitelial do reservatório espermático no istmo, aumentar a eficiência da natação no muco viscoso e penetrar no complexo *cumulus* do ovócito e na zona pelúcida (Simons *et al.* 2014). Já foi demonstrado que espermatozoide bovinos hiperativados apresentam resposta reotática positiva (Kantsler *et al.* 2014; Johnson *et al.* 2017). Um dos resultados deste estudo é que existe uma diminuição da velocidade média de natação e um aumento na angulação da trajetória em relação ao fluxo dos espermatozoides hiperativados, demonstrando que a hiperativação altera a reotaxia dos espermatozoides bovinos. Sabendo que o ovócito fica mais ao centro da ampola da tuba uterina, o aumento do ângulo e a diminuição da velocidade pode proporcionar mais chance dele encontrá-lo. Existe a proposta que o mecanismo de reotaxia é central para permitir aos espermatozoides móveis progredirem em longas distâncias através do trato reprodutivo feminino, sofrerem capacitação e que em cada espécie existem outros mecanismos (termotaxia e quimiotaxia) que modulam a orientação dos espermatozoides hiperativados ao encontro do ovócito (Nair 2020). Portanto, a diminuição da velocidade e o aumento do ângulo pode ser mais um mecanismo de modulação dos espermatozoides ao encontro do ovócito. Além disso, estes resultados corroboram com o único dado conhecido que avalia a influência da hiperativação na reotaxia de sêmen bovino (Johnson *et al.* 2017), no qual também concluiu que a reotaxia foi significativamente alterada pela hiperativação.

A quimiotaxia é um mecanismo que orienta o espermatozoide para sua atração por substâncias (aminoácidos, peptídeos, lipídios, esteróides sulfatados) que são secretadas no fluido folicular e pelo complexo *cumulus* oócito, porém apenas uma fração do esperma

humano capacitado (2–10%) demonstrou ser quimiotaticamente responsivo (Dominguez *et al.* 2018), sugerindo que a função da quimiotaxia seja a atração seletiva de espermatozoides capacitados dentro da ampola pelo oócito maturado (Nair 2020). A alteração que a hiperativação causa na reotaxia do sêmen bovino relatada neste estudo fortalece a proposta de mudança de protagonismo do mecanismo de transporte da reotaxia para a quimiotaxia. Portanto, uma diminuição da velocidade média de natação poderia favorecer a interação do espermatozoide hiperativado com substâncias quimioatraentes.

Embora, Johnson *et al.* (2017) não tenha avaliado diretamente os parâmetros, sugere que quando os espermatozoides de touro hiperativados são expostos a um fluxo de fluido, são capazes de manter o aumento da velocidade de natação, mas alteram seu padrão de natação para linear. Neste presente estudo, o dado evidenciado de que espermatozoides hiperativados que apresentam reotaxia tem uma velocidade média de natação maior do que os espermatozoides que nadam aleatoriamente em ambiente estático vai de acordo com a sugestão. Porém, parte dela é contrariada pelo resultado que demonstra um aumento na angulação da trajetória em relação ao fluxo dos espermatozoides hiperativados.

Em contraste, este estudo mostrou que a hiperativação não altera significativamente a velocidade de natação dos espermatozoides em ambientes estáticos. Apesar de Marquez e Suarez (2006) terem descrito que a hiperativação aumenta a velocidade curvilínea dos espermatozoides, o presente estudo avaliou apenas a velocidade linear, a qual, não apresentou alteração significativa quando comparada com espermatozoides não hiperativados em ambientes estáticos. Em todo o trato genital feminino não existe um ambiente estático no período fértil. Portanto, mesmo que em reprodução assistida as avaliações e processamento seminal geralmente sejam feitas sem fluxo, esses resultados não são relevantes para compreender os processos da reprodução *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que existe um aumento na velocidade média de natação dos espermatozoides hiperativados e não hiperativados bovinos que apresentam resposta reotática quando comparados aos que estão em ambiente estático, o que facilitaria o espermatozoide progredir em um tempo adequado até o ovócito. Os resultados também demonstraram que a hiperativação por heparina diminui a velocidade e aumenta a angulação de natação dos espermatozoides bovinos que apresentam reotaxia, o que pode ser um mecanismo de modulação do deslocamento dos espermatozoides ao encontro do ovócito.

7. REFERÊNCIAS

BETTERA MARCAT, M. A. *et al.* Hitting the wall: Human sperm velocity recovery under ultra-confined conditions. *Biomicrofluidics*. 2020, **14** (2). <https://doi.org/10.1063/1.5143194>

CHANG, M.C. Fertilization of Rabbit Ova in vitro. **Nature**. 1959, 184, 466-467.

DE MARTIN, H. *et al.* Positive rheotaxis extended drop: a one-step procedure to select and recover sperm with mature chromatin for intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017, **34** (12), 1699–1708. <https://doi.org/10.1007/S10815-017-1024-1>

DENISSENKO, P. *et al.* Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of America. 2012, **109** (21), 8007–8010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202934109>

DOMINGUEZ, E. *et al.* Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis. *Theriogenology*. 2018, **122**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.023>.

DYER, S. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Human Reproduction*. 2016, **31** (7), 1588–1609. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew082>

EL-SHERRY, TM *et al.* Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integrative Biology*. 2014, **6** (12), 1111–1121. <https://doi.org/10.1039/c4ib00196f>

FAIR, S. E ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. *Theriogenology*. 2019, **137**, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.032>

GIOJALAS, L. C.; GUIDOBALDI, H. A. Getting to and away from the egg, an interplay between several sperm transport mechanisms and a complex oviduct physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2020, **518** (8). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110954>

HYAKUTAKE, T. *et al.* Experimental study on the effect of flow in microfluidic channel on bovine sperm navigation. *Journal of Biomechanics*. 2021, **118** (7). <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2021.110290>

JOHNSON, P. *et al.* Genomic identification, expression profiling, and functional characterization of CatSper channels in the bovine. *Biology of Reproduction*. 2017, **97**(2), 302–312. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox082>

KANTSLE, V. *et al.* Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife*. 2014, **3**, e02403. <https://doi.org/10.7554/eLife.02403>

LONERGAN, P. *et al.* Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 2001, **41** (5), 427 - 437. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>

LOUX, S. *et al.* CatSper and the Relationship of Hyperactivated Motility to Intracellular Calcium and pH Kinetics in Equine Sperm. *Biology of Reproduction*. 2013, **89** (5), 1–15. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111708>

MARQUEZ, B. e SUAREZ, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline Stimulated Ca²⁺ Influx. *Biology of Reproduction*. 2006, **76** (4), 660–665. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055038>

MIKI, K.; CLAPHAM, D. E. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Current Biology*. 2013, **23**, (6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.007>

NAGATA, M. P. B. *et al.* Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine

spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018, **115** (14), E3087–E3096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717974115>

NAIR, S. Maternal control of gamete choice during fertilization. International Journal of Developmental Biology. 2020, **64** (3), 185–190. <https://doi.org/10.1387/ijdb.190156sn>

PARRISH, J. Bovine In vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. Theriogenology. 2014, **81** (1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>

PARRISH, J. *et al.* Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. Biology of Reproduction. 1988, **38** (5), 1171–1180. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>

RAPPA, K. *et al.* Quantitative analysis of sperm rheotaxis using a microfluidic device. Microfluidics and Nanofluidics. 2018, **22** (9), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10404-018-2117-6>

ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. *et al.* Hyperactivated stallion spermatozoa fail to exhibit a rheotaxis-like behaviour, unlike other species. Scientific Reports. 2018, **8** (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34973-9>

ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. *et al.* Sperm selection by rheotaxis improves sperm quality and early embryo development. Reproduction. 2021, **161** (3), 343–352. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0364>

SIMONS, J. *et al.* The dynamics of sperm detachment from epithelium in a coupled fluid-biochemical model of hyperactivated motility. Journal of Theoretical Biology. 2014, **354**, 81–94, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.03.024>

SUAREZ, S. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. Reproduction, Fertility and Development. 2006, **19** (1), 103–110. <https://doi.org/10.1071/RD0610>

TUNG, C. K. *et al.* Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. Lab Chip. 2014, **14**, 1348–1356. <https://doi.org/10.1039/c3lc51297e>

WANG, S.; LARINA, I. V. In vivo three-dimensional tracking of sperm behaviors in the mouse oviduct. Development (Cambridge). 2018, **145** (6). <https://doi.org/10.1242/dev.157685>

XU, H. *et al.* Sperm Micromotors for Cargo Delivery through Flowing Blood. ACS Nano. 2020, **14** (3), 2982–2993. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.9b07851>

ZAFERANI, M.; CHEONG, S. H.; ABBASPOURRAD, A. Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018, **115** (33), 8272–8277.

<https://doi.org/10.1073/pnas.180081911>