



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE
SILPURAN[®] PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

MOSSORÓ

2019

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE
SILPURAN® PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

D363 Dantas Fernandes, Beatriz.

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À
BASE DE SILICONE SILPURAN® PARA SELEÇÃO DE

ESPERMATOZOIDES BOVINOS / Beatriz Dantas
Fernandes. - 2019.

65 f. : il.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal

Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE
SILPURAN® PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 19 /12 / 2019.

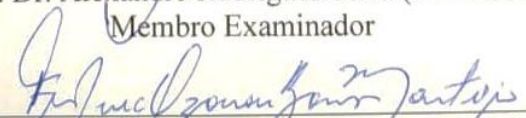
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro (UFRA)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BEATRIZ DANTAS FERNANDES – Nascida em Brasília-DF no dia 29 de outubro de 1995, filha de Josemar Fernandes de Oliveira e Lucimar Dantas Fernandes. Graduiu-se em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) em 2017.2. Durante a graduação foi monitora nas disciplinas de Patologia Animal e Clínica e Cirurgia de Equídeos, além de ser aluna de iniciação científica (PIBIC) e atuar em projetos de extensão e inovação tecnológica. Em novembro de 2017 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, ao nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de mestrado desenvolveu pesquisa com técnicas para seleção de espermatozoides de bovinos, além de ter trabalho com Produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Grande Arquiteto do Universo, por ter me sustentado durante esses anos de estudo e nos momentos de dificuldades e pelas demonstrações de amor, carinho e cuidado durante minha jornada.

Aos meus pais, Josemar Fernandes de Oliveira e Lucimar Dantas Fernandes, por entenderem meus momentos de ausência e apesar disso, sempre me apoiarem durante minha formação como pessoa e como profissional. Vocês serão sempre meus maiores exemplos de humildade e amor.

Aos meus irmãos Jônatas Dantas Fernandes, Sara Dantas Fernandes e Josemar Fernandes de Oliveira Júnior, por serem minha base e fonte de renovação de alegria e inspiração.

Ao meu amigo e namorado, Gilderlândio Pinheiro Rodrigues por todo apoio dado e por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me ajudando a buscar ser melhor, me tranquilizando e vibrando em conjunto a cada conquista.

À Fernanda Araújo dos Santos por toda amizade, companheirismo, conselhos e ensinamentos passados durante esses 2 anos. Você foi um presente que o mestrado me deu e sou eternamente grata. Que você possa servir de inspiração para muitas outras pessoas.

Aos meus amigos e segunda família, Jéssica Monique, Bismark Alves, Pedro Paulo e Joseneide dos Santos por permitirem que eu fizesse parte da família, me auxiliando em todos os momentos e torcendo por cada conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra pela confiança depositada e oportunidade de realizar projetos e práticas no laboratório.

Aos demais amigos do Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais que auxiliaram na execução do projeto e pelos momentos de brincadeiras Suelen de Cristo, Katyane Barros, Natanael Teixeira, Marcos Vinícius, Gleyson Araújo, Géssica Vitalino.

À Luana Grasielle, por auxiliar grandiosamente nas avaliações no decorrer do projeto e Parmênedes Dias pelo auxílio na realização das estatísticas.

Ao Professor Alexandre Rodrigues, por ter cedido o laboratório e equipamentos para execução da pesquisa e por sempre estar disponível a contribuir no engradecimento dos discentes.

Aos funcionários do ABATEDOURO FRIGORÍFICO INDUSTRIAL DE MOSSORÓ, em especial “Sapinho” e “Reizinho”, os quais sempre foram solícitos e contribuíram para a coleta de material biológico.

“Comece fazendo o que é necessário, depois
o que é possível, e de repente você estará
fazendo o impossível”.
(São Francisco de Assis)

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE SILPURAN[®] PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

FERNANDES, Beatriz Dantas. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE SILPURAN[®] PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2019.

A seleção espermática consiste em etapa fundamental em técnicas reprodutivas como a PIVE. Entretanto, os métodos usualmente utilizados podem causar danos à integridade da célula. Dispositivos microfluídicos foram desenvolvidos com a finalidade de selecionar os espermatozoides sem a utilização de centrifugação e com redução do tempo. Porém, embora estes sejam confeccionados com materiais considerados de baixo custo, ainda são relativamente caro. Objetivou-se avaliar a toxicidade de um novo dispositivo microfluídico confeccionado a partir do silicone Silpuran[®] e realizar a seleção de espermatozoides epididimários testando-se a quimiotaxia por diferentes substâncias. Para tanto, foram utilizados 10 Complexos testículos epidídimos para cada parte do experimento e avaliou-se os parâmetros de cinética dos espermatozoides com a utilização do sistema de análise computadorizada (CASA), morfologia, integridade e a viabilidade da membrana plasmática. No experimento 1, para avaliar a toxicidade do silicone, foi utilizado o teste de termoresistência lento, em que as amostras do controle e tratamento foram mantidas em incubadora a 37,5°C e avaliadas em diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 min). Os dados foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney. Os parâmetros de MT, MP, VSL, VCL e VAP dos espermatozoides epididimários depositados no dispositivo foram superiores aos do controle. O uso do silicone Silpuran[®] na confecção dos dispositivos microfluídicos não foi tóxico para as células e apresentou resultados satisfatórios em relação ao controle. Para o experimento 2, referente ao de seleção espermática, o dispositivo microfluídico, formado por um reservatório central e mais 4 reservatórios ao redor interligados por canalículos, foi preparado com solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos maturados e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona à 0,05% nos reservatórios periféricos e uma alíquota da amostra no reservatório central. Após preenchido, o dispositivo foi incubado por 30 min. Como técnica controle foi utilizado o gradiente de Percoll[®]. Os dados foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os espermatozoides epididimários coletados dos reservatórios contendo SS, meio MIV e meio MIV + O foram semelhantes ao encontrado pela técnica de Percoll[®]. Para os parâmetros de MT e MP, os meios MIV e MIV + O apresentaram maior porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais em relação ao Percoll[®]. O dispositivo microfluídico foi eficiente na seleção de espermatozoides epididimários, os quais foram mais atraídos para os meios SS, MIV e meio MIV + O.

Palavras-chave: Dispositivo microfluídico. Fertilização *in vitro*. Polidimetilsiloxano. Teste de termoresistência.

DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEM BASED ON SILPURAN[®] SILICONE FOR THE SELECTION OF BOVINE SPERM

FERNANDES, Beatriz Dantas. DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEM BASED ON SILPURAN[®] SILICONE FOR THE SELECTION OF BOVINE SPERM. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2019.

Sperm selection consists of a fundamental stage in reproductive techniques such as PIVE. However, the methods usually used can cause damage to cell integrity. Microfluidic devices were developed in order to select sperm without the use of centrifugation and with time reduction. However, although these are made with materials considered low cost, they are still relatively expensive. The objective of this study was to evaluate the toxicity of a new microfluidic device made from Silpuran[®] silicone and to perform the selection of epididymis sperm by testing chemotaxis by different substances. For this purpose, 10 epididymis testicle complexes were used for each part of the experiment and the kinetic parameters of sperm with the use of the computerized analysis system (CASA), morphology, integrity and viability of the plasma membrane. In experiment 1, to evaluate silicone toxicity, the slow thermoresistance test was used, in which the control and treatment samples were kept in incubator at 37.5°C and evaluated at different times (0, 60, 120 and 180 min). The data were compared using the Mann-Whitey test. The parameters of MT, MP, VSL, VCL and VAP of the epididymis sperm deposited in the device were higher than those of the control. The use of Silpuran[®] silicone in the manufacture of microfluidic devices was not toxic to cells and presented satisfactory results in relation to the control. For experiment 2, referring to the saline selection, the microfluidic device, formed by a central reservoir and 4 more reservoirs around interconnected by canals, was prepared with saline solution 0.9%, middle MIV, middle + matured oocytes and middle MIV + medroxyprogesterone acetate at 0.05% in peripheral reservoirs and a sample rate in the central reservoir. After filling, the device was incubated for 30 min. As a control technique, the Percoll[®] gradient was used. The data were compared using the Kruskal-Wallis test. The epididymis sperm collected from reservoirs containing SS, middle MIV and middle MIV + O were similar to that found by Percoll[®] technique. For the parameters of MT and MP, the MIV and MIV + O showed a higher percentage of morphologically normal sperm in relation to Percoll[®]. The microfluidic device was efficient in the selection of epididymis sperm, which were more attracted to the SS, MIV and MIV + O media.

Key-words: *In vitro* fertilization. Microfluidic device. Polydimethylsiloxane. Thermoresistance test.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Esquema de dispositivo microfluídico desenvolvido com dimensões utilizadas para reservatório central, reservatórios de saída e trajeto entre reservatórios.....	42
Figura 2	Molde mestre do dispositivo e confecção de réplica final com o uso do silicone Silpuran®	42
Figura 3	Esquema de distribuição dos meios no dispositivo microfluídico para avaliar a seleção de espermatozoides provenientes do epidídimo e de sêmen descongelado.....	45
Figura 4	Média ($\pm$ desvio padrão) da quantidade de células (%) com viabilidade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico de silicone (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.....	49
Figura 5	Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células com viabilidade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo submetidos ao teste de seleção por gradiente de Percoll® e através de sistema microfluídico, avaliando-se a quimiotaxia de diferentes substâncias (solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Média ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo de bovinos submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em placa microfluídica de silicone (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.....	48
Tabela 2	Médias ($\pm$ desvio padrão) da avaliação morfológica (%) de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo de bovinos submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min), avaliando-se células normais, defeitos de cauda (AC%), defeitos de peça intermediária (AP%) e defeitos de cabeça (AK%).....	49
Tabela 3	Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células espermáticas bovinas, com membrana plasmática íntegra, provenientes da cauda do epidídimo e de palhetas de sêmen descongeladas submetidas ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico de silicone (tratamento) e em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.....	50
Tabela 4	Média ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides bovinos provenientes da cauda do epidídimo e submetidos a seleção espermática através do gradiente de Percoll [®] e no dispositivo microfluídico, avaliando a quimiotaxia por diferentes substâncias (solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).....	52
Tabela 5	Médias ($\pm$ desvio padrão) da avaliação morfológica (%) de espermatozoides bovinos provenientes da cauda do epidídimo e submetidos à seleção espermática através do gradiente de Percoll [®] e em dispositivo microfluídico avaliando-se a quimiotaxia por diferentes meios (solução salina 0,09%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual que
≤	Menor ou igual que
®	Marca registrada
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μm/s	Micrômetro por segundo
AC	Defeitos de cauda
AFIM	ABATEDOURO FRIGORÍFICO INDUSTRIAL DE MOSSORÓ
AI	Avaliação inicial
AK	Defeitos de cabeça
ALH	Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça
AP	Defeitos de peça intermediária
ATP	Trifosfato de adenosina
BCF	Frequência de batimentos
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CASA	Análise computadorizada de espermatozoides
CCOs	Complexo cúmulus-oócitos
cm	Centímetros
CNPJ	Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
CO ₂	Dióxido de carbono
CTE	Complexo testículo-epidídimo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Gauge
G	Gramas
h	Hora
HOST	Teste hiposmótico
Hz	Hertz
LIN	Linearidade
Meio MIV	Amostra do reservatório com meio MIV
Meio MIV+O	Amostra do reservatório com meio MIV + oócitos
Meio MIV + MAP	Amostra do reservatório com meio MIV + acetato de medroxiprogesterona à 0,05%
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar

mmol/L	Milimol por litro
mOsm/L	Miliosmoles por litro
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NaCl	Cloreto de sódio
nmol/L	Nanomoles por litro
°C	Grau Celsius
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína quinase A
PTK	Proteína tirosina quinase
RN	Rio Grande do Norte
seg	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
STR	Retilinearidade
TRIMA	Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais
T.T.L	Teste de termoresistência lento
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VAP	Velocidade de Trajeto
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Progressiva

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2.1 Características dos espermatozoides bovinos	19
1.2.1.1 Membrana plasmática	19
1.2.1.2 Espermatozoides epididimários	20
1.2.2 Seleção espermática	21
1.2.2.1 Swim up	22
1.2.2.2 Gradiente de percoll	22
1.2.2.3 Sistema microfluídico	22
1.2.3 Avaliação espermática	24
1.2.3.1 Análise computadorizada de espermatozoides (CASA)	24
1.2.3.2 Viabilidade celular	25
1.2.3.3 Potencial mitocondrial	26
1.2.3.4 Teste de resistência osmótica	26
1.2.3.5 Morfologia espermática	27
1.2.3.6 Teste de termoresistência	28
REFERÊNCIAS	28
1.3 OBJETIVOS	37
1.3.1 Objetivo geral	37
1.3.2 Objetivos específicos	37
CAPÍTULO I	38
Introdução	39
Material e métodos	41
Comitê de ética	41
Produtos químicos	41
Local de coleta e processamento	41
Desenho e confecção do dispositivo microfluídico	41
Origem dos espermatozoides	43
Espermatozoides epididimários	43

Preparação de oócitos.....	43
Avaliação de toxicidade	43
Delineamento experimental 2.....	44
Teste de seleção espermática.....	44
Avaliação espermática.....	45
Análise estatística.....	46
Teste de seleção espermática.....	50
Discussão	55
Conclusão	58
REFERÊNCIAS	58

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução animal são ferramentas com grande importância, responsáveis por proporcionar maior eficiência da pecuária nacional por meio do desenvolvimento científico e tecnológico. Biotécnicas a exemplo da Fertilização *in vitro* (FIV) permitem a expansão e seleção do material genético adequado, com o intuito de obter o maior número de descendentes em curto período de tempo e que animais geneticamente superiores expressem características desejadas. Devido ao contínuo esforço de produtores, pesquisadores e médicos veterinários, o Brasil se tornou grande utilizador e multiplicador destas tecnologias, o que colocou o país na condição de maior produtor de embriões por FIV do mundo (VIEIRA, 2012; MARTINS et al., 2016).

Dentre as diversas biotécnicas da reprodução, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem papel de destaque no cenário atual (VIANA; FIGUEIREDO, 2016). A PIVE foi sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação, promovendo aumento significativo em seu uso por todo país, com reconhecimento internacional (NEVES et al., 2010).

A seleção espermática é necessária na fertilização *in vitro* (FIV), pois é um dos critérios mais importante para se alcançar sucesso na fertilização, no desenvolvimento embrionário e na confirmação da prenhez (SAID; LAND, 2011; NOSRATI et al., 2014). O objetivo de se realizar a seleção espermática consiste em separar os espermatozoides viáveis e móveis do plasma seminal, em busca de concentrar o maior número de espermatozoides móveis em volume relativamente inferior (HENKEL; SHILL, 2003; GARCÍA-HERREROS; LEAL, 2014; MORRELL et al., 2017).

Dentre os métodos mais utilizados atualmente para realização de seleção espermática, a técnica de swim-up e por gradiente de Percoll[®] possuem destaque entre as técnicas de reprodução assistida. Essas dependem da migração ou sedimentação dos espermatozoides para realizar a separação. Entretanto, podem não ser tão eficazes durante a seleção de espermatozoides, pois podem causar redução na motilidade ou danos devido à centrifugação, induzir a fragmentação do DNA, assim como, aumentar o número de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MALVEZZI et al., 2014; NOSRATI et al., 2014). A técnica ideal para seleção espermática deve ser rápida, fácil e de baixo custo, isolar a maior quantidade de espermatozoides móveis, não causar danos ou alterações fisiológicas que elimine espermatozoides mortos (HENKEL; SHILL, 2003). Portanto, há necessidade de se pesquisar métodos mais avançados para seleção espermática (SAID; LAND, 2011).

Quando comparadas com técnicas convencionais de seleção espermática, as microplacas baseadas em tecnologias microfluídicas fornecem um dos métodos mais apropriados para separar de forma rápida os espermatozoides viáveis e móveis, mantendo a integridade do DNA sem causar danos mecânicos à célula (SMITH; TAKAYAMA, 2007; SANO et al., 2010). Essa técnica de seleção geralmente se baseia no bombeamento ativo por equipamentos externos, com auxílio de seringa, ou por bombeamento passivo, por pressão hidrostática (LI et al., 2016a). A quimiotaxia também pode ser utilizada como mecanismo de seleção de espermatozoides, em que esses serão guiados até um gradiente de concentração (LI, et al., 2016a).

Alguns materiais e técnicas foram utilizados para confecção de dispositivos microfluídicos (LI et al., 2016a; NAGATA et al., 2018). Porém, apesar de serem fabricados em um tipo de polidimetilsiloxano (PDMS) e se apresentem como alternativas de baixo custo, esses materiais ainda são relativamente caros (SAMUEL et al., 2018) e não se enquadrariam na realidade de muitos profissionais autônomos. Com isso, a busca para desonerar a técnica torna-se importante, tendo como nova proposta a utilização do silicone Silpuran[®] (Polisil Indústria e Comércio de Silicone LTDA, São Paulo). O Silpuran[®] 2420 A / B é um polímero de polidimetilsiloxano (PDMS), que compreende dois componentes (A e B) com grupos funcionais e auxiliares para reticulação adicional mediada por um catalisador de platina. A mistura dos componentes A e B forma um adesivo de silicone macio e pegajoso, que após a vulcanização térmica é altamente transparente e já demonstrou ser quimicamente inerte na produção de curativos à base de alginato e quitosana (PIRES; MORAIS, 2015).

As tecnologias microfluídicas foram introduzidas neste meio no início do século XXI em busca de aumentar as taxas de fertilização e de estabelecer plataforma automática para contagem e seleção de espermatozoides a serem utilizados na FIV. A implementação de novas tecnologias é necessária para explorar descobertas científicas e melhorar os resultados passados, para avançar nas tecnologias de reprodução assistida (TSAI et al., 2016).

Dentro dessa perspectiva, há necessidade em realizar mais estudos a fim de criar novos dispositivos microfluídicos com material que barateie a técnica e não seja tóxico para as células.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Características dos espermatozoides bovinos

A espermatogênese ocorre em ciclos, que corresponde ao espaço de tempo compreendido entre o aparecimento sucessivo de um mesmo tipo de associação celular em determinado segmento do epitélio seminífero. Em bovinos, a duração média de um ciclo é de aproximadamente 14 dias e para se completar o processo de espermatogênese são necessários de quatro a cinco ciclos sucessivos. Assim, o tempo total gasto é de 61 dias. Já a passagem do espermatozoide através do epidídimo leva em torno de 10 a 14 dias. Dessa forma, depois de qualquer processo degenerativo, a retomada da produção espermática pode ser esperada após 70 dias (REICHENBACH et al., 2008).

A cabeça de espermatozoide bovino possui formato arredondado e achatado, sendo a maior parte constituída pelo núcleo. Tem como função armazenar o material genético, compreendido em cromatina altamente compactada (MARTINS et al., 2016), apresentando 0,29 μm de altura, perímetro de 28,4 μm e área de superfície de 46,9 μm^2 (CARVALHO, 2013). Os dois terços anteriores do núcleo espermático são recobertos pelo acrossomo, formado por dupla camada de membranas e que contém glicoproteínas e enzimas lisossômicas essenciais à penetração no oócito durante a fecundação: hialuronidase (ação mucolítica), glicosidase, esterase e protease (MARTINS et al., 2016).

A cauda é a parte inferior do espermatozoide, composta pelo colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. Esta possui função locomotora, sendo um filamento protoplasmático longo e móvel (REICHENBACH et al., 2008).

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais, considerado pré-requisito para o processo de fertilização (ARRUDA et al., 2011).

1.2.1.1 Membrana plasmática

Os espermatozoides são circundados pela membrana plasmática, que consiste em uma barreira entre os ambientes externos e internos da célula, sendo composta por lipídeos, proteínas, glicolipídeos e glicoproteínas, que se arranjam em uma estrutura de bicamada. A membrana plasmática possui grande importância na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo de fêmeas e em sua capacidade fecundante. Desta forma, qualquer alteração em sua integridade pode levar à morte ou torná-lo infértil (BAILEY, 2010; MUGHAL et al., 2018).

A membrana plasmática se aproxima do núcleo devido à redistribuição do citoplasma, tendo o acrossoma entre essas estruturas, induzindo a polaridade no desenvolvimento do espermatozoide. Durante o trânsito do espermatozoide através do epidídimo, a membrana plasmática sofre mudanças devido à liberação e absorção de proteínas e lipídeos (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Os lipídeos presentes na membrana dos espermatozoides são importantes tanto para a fluidez como flexibilidade do espermatozoide (KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007), enquanto as proteínas estão envolvidas no processo de ligação do espermatozoide ao oócito. Cada região da membrana plasmática possui domínios e funções específicas. A região que recobre a cabeça do espermatozoide é responsável pela ligação com o oócito; a que recobre a peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias, estão envolvidas na produção de energia e a região que recobre o flagelo possui relação com a motilidade (FLESCHE; GADELHA, 2000).

A membrana plasmática dos espermatozoides tem papel fundamental no processo de fertilização, e o estado do DNA, localizado na região da cabeça, pode ser relacionado ao potencial reprodutivo dos animais. Qualquer alteração em sua integridade afeta as taxas de fertilidade (ANSARI et al., 2014; MUGHAL et al., 2018).

1.2.1.2 Espermatozoides epididimários

A utilização de espermatozoides epididimários possibilita a utilização do material genético de reprodutores que possuem alto valor zootécnico e ficaram impossibilitados de realizar monta natural ou que morreram inesperadamente. Esse uso também pode ser aplicado em animais que estão ameaçados de extinção, representando uma das únicas oportunidades de se obter esse material e de preservar e manter bancos de germoplasma (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017). Os espermatozoides colhidos do epidídimo de touros *post-mortem* possuem grande potencial para serem utilizados na fecundação *in vitro*, e devido ao fato de ser a última oportunidade de se utilizar o material genético, apresenta maior valor no mercado (BARBOSA et al., 2012).

Coletas de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo já foram relatadas em suínos (KIKUCHI et al., 1998), caprinos (BLASH et al., 2000), ovinos (KAABI et al., 2003), cervídeos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006), caninos e felinos (TITTARELLI et al., 2006), equinos (WEISS et al., 2008) e bovinos (REYES-MORENO et al., 2002; BERTOL et al., 2013; CHAVEIRO et al., 2015; CUNHA et al., 2017).

A motilidade de espermatozoides provenientes do epidídimo de touro pode ser inferior quando comparado aos do sêmen coletado por eletroejaculação, devido aos efeitos do tempo e falta de plasma seminal na amostra. Espermatozoides epididimários podem apresentar declínio em sua motilidade após 24 horas de coleta, com taxa de recuperação de 41,25% quando mantidos em temperatura de 18 – 20°C. Entretanto, os defeitos morfológicos aumentam a partir de 12 horas após o óbito (BERTOL et al., 2013; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017).

Quando os epidídimos são mantidos sob refrigeração logo após a morte, a viabilidade dos espermatozoides pode ser mantida por longos períodos em diferentes espécies. Entretanto, na realidade do sistema extensivo de produção de gado no Brasil, quando a carcaça do animal é encontrada, muitas horas já podem ter se passado desde que foi exposta à temperatura ambiente (BERTOL, 2013).

1.2.2 Seleção espermática

Para se obter sucesso na FIV, a qualidade dos espermatozoides é fator primordial, mais especificamente quando relacionado a sua motilidade e viabilidade. Devido a isso, métodos efetivos devem ser aplicados durante esta etapa da PIVE para se alcançar bons resultados por meio da seleção de espermatozoides (NOSRATI et al., 2014).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para realizar a separação de espermatozoides móveis, como o método de migração ascendente (swim-up) e o gradiente de Percoll®. Porém esses métodos, além de serem mais trabalhosos e demandarem mais tempo, possuem limitações, que incluem a diminuição da motilidade e aumento da probabilidade de danos ao DNA dos espermatozoides devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZAFERANI et al., 2018).

A integridade do DNA de espermatozoides é fundamental para que se alcance fertilização adequada, bom desenvolvimento embrionário e descendentes saudáveis (COLLINS, 2008; SIMON, 2014). Portanto, a necessidade de métodos avançados de seleção de espermatozoides que mantenham essa integridade é evidente (DISSE, 2011).

A fim de se buscar outros métodos de seleção espermática para se utilizar em tecnologias reprodutivas artificiais e que não fizessem uso de centrifugação, o sistema microfluídico foi desenvolvido. Métodos que contornam o uso da centrifugação podem ser benéficos em tratamentos de infertilidade (ZAFERANI et al., 2018).

1.2.2.1 Swim up

O swim-up corresponde à técnica mais antiga e comumente utilizada para seleção espermática, realizando a separação baseada nos movimentos ativos dos espermatozoides (GARCIA-HERREROS; LEAL, 2014). Este consiste no método mais barato e usado em laboratórios de FIV por todo o mundo (ARIAS et al., 2017).

No swim-up os espermatozoides vivos são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores pela motilidade ascendente. Em contrapartida, quando comparado ao método de centrifugação por gradiente de densidade, esta técnica diminui consideravelmente as taxa de motilidade e de concentração de espermatozoides, devido à presença de camadas de espermatozoides nos níveis inferiores do pellet, que podem obstruir a possibilidade de ascenderem ao meio (ÁVILA, 2015; CESARI et al., 2006).

1.2.2.2 Gradiente de percoll

Na separação espermática com o Percoll[®], o sêmen é centrifugado pela passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, com base na diferença de densidade. O Percoll[®] é composto por partículas de sílica coloidal cobertas com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar o gradiente necessário de separação espermática (ARIAS et al., 2017).

O Percoll[®] é um dos métodos mais rápidos e efetivos para remover o plasma seminal e crioprotetores (LEE, 2009). Porém, apesar de ser a melhor escolha para a seleção de espermatozoides bovinos, apresenta maior porcentagem de espermatozoides com acrossomas parcialmente perdidos após utilização deste em comparação com swim-up. (CESARI et al., 2006).

1.2.2.3 Sistema microfluídico

Devido às vantagens da utilização de dispositivos microfluídicos, esses estão sendo aplicados cada vez mais a diversas áreas de pesquisa biológica, como para análise ou separação de DNA, proteínas e células móveis, visando reproduzir de forma semelhante às condições *in vivo*. Com isso, a utilização de dispositivos microfluídicos pode ser o método mais adequado para se separar espermatozoides viáveis (KO et al., 2012).

As técnicas microfluídicas se originaram a partir de tentativas de miniaturizar dispositivos de análise química e biológica em laboratório baseadas nos princípios físicos do comportamento dos fluidos em ambiente microscópico (HUANG et al., 2017). Os

dispositivos atuais são geralmente chamados de “sistemas de análise de laboratório em um chip” ou “lab-on-chip” e funcionam permitindo que processos e interações biológicas ou químicas ocorram à medida que o líquido flui dentro de canais e câmaras em miniatura (DUSTE; YUSOF, 2011).

O sistema microfluídico veio como promessa de se tornar uma alternativa melhorada no processo de PIVE. O uso desse sistema forneceu método simples, não traumático e capaz de isolar os espermatozoides móveis sem realizar centrifugação, como é feito em outras técnicas (SMITH; TAKAYAMA, 2007). Dentre os principais objetivos e vantagens de se utilizar os dispositivos em miniatura têm-se: reduzir o tempo, custos com equipamentos e consumo de reagentes, que protocolos macroscópicos exigem, além de executar possíveis procedimentos impossíveis de serem realizados em dispositivos macroscópicos (CHO et al., 2003).

Vários métodos utilizando o sistema microfluídico para separação de espermatozoides móveis foram realizados (CHO et al., 2003; KOYAMA et al., 2006; ZHANG et al., 2015; LI et al., 2016a; LI et al., 2016b). Porém, algumas técnicas utilizam bombeamento ativo com o auxílio de equipamentos externos, como uma bomba de seringa ou bombeamento passivo por pressão hidrostática. Como esses métodos geram um fluxo laminar, os espermatozoides com motilidade não progressiva são igualmente movidos e podem entrar no fluxo laminar que deveria selecionar os espermatozoides móveis, comprometendo o isolamento de apenas espermatozoides com motilidade progressiva (WHEELER; RUBESSA, 2017).

Outro método possível de ser utilizado é a quimiotaxia, a qual consiste em mecanismo de transporte celular, que guia os espermatozoides até um gradiente de concentração de atrativos e que pode ser usada como ferramenta para selecionar espermatozoides móveis (LI, et al., 2016a). Este sistema de microchip foi utilizado para realizar a separação de espermatozoides de camundongos com motilidade progressiva daqueles com motilidade não progressiva e imóveis, utilizando a acetilcolina como quimioatraente (KO et al., 2012).

Em estudo realizado com sistema microfluídico para separar espermatozoides móveis progressivos de bovinos utilizando quimiotaxia induzida por progesterona, observou-se que a porcentagem de espermatozoides contendo mitocôndrias de alta atividade ($47,6\% \pm 6,0\%$), de espermatozoides móveis ($57,7\% \pm 2,2\%$) e de acrossoma intacto ($66,8\% \pm 2,1\%$) foi significativamente maior com o microchip de microcanais de 7,5 mm do que com o método de swim-up, que apresentou resultados de $23,6\% \pm 4,7\%$; $38,2 \pm 5,2$; e $36,0 \pm 4,1$,

para as mesmas avaliações, respectivamente (LI et al., 2016a). Esse sistema também foi utilizado para selecionar espermatozoides viáveis de sêmen sexado, realizar a FIV e melhorar a produção *in vitro* de embriões bovinos, alcançando taxas superiores de blastocisto ($40,12\% \pm 2,61$), quando comparados a técnica padrão de FIV ($24,55\% \pm 4,54\%$) (LI et al., 2016b).

Com espermatozoides humanos, o sistema microfluídico também melhorou a eficiência nas suas qualidade e quantidade, estes contados a partir de quatro canais de saídas, demonstrando que a quantidade de espermatozoides vivos pode ser aumentada se mais saídas forem usadas no sistema (HUANG et al., 2014). Ainda com humanos, a utilização de dispositivo microfluídico com três entradas e três saídas teve eficiência de 90%, o qual não só coletou os espermatozoides vivos como também aqueles com maior motilidade, que conseguiam nadar através do fluxo laminar (HUANG et al., 2017).

Ainda é necessária maior investigação sobre o uso do sistema microfluídico para avaliar melhor as utilidades e segurança do dispositivo. Visto a importância da espécie bovina no cenário atual de tecnologias reprodutivas, a utilização deste dispositivo pode melhorar os resultados encontrados com as técnicas praticadas atualmente (SHIROTA et al., 2016).

1.2.3 Avaliação espermática

A avaliação do sêmen possui grande importância, pois há diversas características funcionais e estruturais dos espermatozoides, que são vitais para a fertilização e, posteriormente, para desenvolvimento embrionário (KASIMANICKAM et al., 2017). Além disso é de grande importância para avaliação de desempenho de novos protocolos de seleção de espermatozoides.

1.2.3.1 Análise computadorizada de espermatozoides (CASA)

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros na avaliação da capacidade fecundante do sêmen. O índice de motilidade total corresponde à proporção do número total de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen. O índice de motilidade progressiva se refere apenas à proporção do número de espermatozoides com motilidade progressiva em uma amostra. Esses índices apresentam correlação à fertilidade do sêmen e possui grande valor para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (ARRUDA et al., 2011).

A primeira avaliação da motilidade deve ser realizada imediatamente após a obtenção do ejaculado/espermatozoides. O exame é feito sob microscopia comum de campo claro, com uma gotícula (2 a 4 μL) do sêmen puro ou da diluição da amostra de espermatozoides entre lâmina e lamínula, em aumento de 10 a 40x. A temperatura ideal para o exame é de 37°C, devendo-se evitar variações térmicas entre a colheita e a avaliação. Quando a concentração espermática for muito alta, pode-se diluir o sêmen antes da avaliação (REICHENCACH et al., 2008).

A motilidade pode ser estimada de forma subjetiva, porém sistemas de análises mais precisos, como a análise do sêmen computadorizada (CASA), têm sido propostos para avaliar a motilidade espermática e diminuir os erros da avaliação convencional.

Dentre os parâmetros possíveis de avaliação pelo CASA, tem-se: Motilidade total (%) referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima em relação a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), que corresponde à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), referente a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (ARRUDA et al., 2011; ABUD et al., 2014).

1.2.3.2 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade de espermatozoides é essencial para se alcançar bons resultados no momento da fertilização. O uso de sondas fluorescentes consiste em técnica não invasiva que permite visualizar o metabolismo de células. Presume-se que as células viáveis tenham membranas celulares intactas e fechadas, que não podem ser penetradas por alguns compostos de coloração, enquanto as células mortas são consideradas como tendo membranas rompidas (STIEFEL et al., 2015; YUE et al., 2017).

O Hoechst 33342 pertence à categoria da bisbenzimidazina, a qual penetra a membrana e se liga a regiões do DNA ricas em adenina-timinina. Este material apresenta alta

persistência de coloração e fluorescência e é utilizado como rastreador de células, sendo utilizado para determinar as porcentagens de acrossoma vivo (SCHENDZIELORZ et al., 2016; STEINHAUSER et al., 2016). Enquanto isso, o iodeto de propídio liga-se diretamente ao DNA e só é possível caso a membrana dos espermatozoides esteja comprometidas. Em caso de células que apresentam estágio de apoptose precoce, a membrana da célula permanece intacta, impedindo a coloração com iodeto de propídio (PIETKIEWICZ et al., 2015). Espermatozoides marcados em azul (Hoechst 33342) foram classificados como tendo membrana espermática intacta, e aqueles marcados totalmente ou parcialmente em vermelho (Iodeto de propídio) foram classificados como não intactos (CELEGHINE et al., 2007).

1.2.3.3 Potencial mitocondrial

As mitocôndrias das células espermáticas estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e tem como função produzir ATP e gerar energia para o batimento flagelar, fornecendo motilidade ao espermatozoide (CELEGHINI et al., 2007). Alterações no potencial da membrana mitocondrial podem resultar em modificações na motilidade dos espermatozoides, fator que pode ser relacionado à infertilidade (GRAVANCE et al., 2000; GLAZAR, 2014).

Para avaliar a função mitocondrial, pode-se utilizar a sonda fluorescente MitoTracker, a qual irá marcar seletivamente mitocôndrias na peça intermediária de células espermáticas, de acordo com o potencial mitocondrial de membrana. A depender da intensidade da marcação, as células serão discriminadas como possuindo mitocôndrias ativas (corando-se em amarelo). Caso haja redução na intensidade pode indicar degradação das mitocôndrias e espermatozoides inaptos a fecundação (KLIONSKY et al., 2012; SATI et al., 2015; MOSCATELLI et al., 2017; CLUTTON et al., 2018).

1.2.3.4 Teste de resistência osmótica

Os espermatozoides ao passarem do trato reprodutivo de machos para o das fêmeas experimentam uma diminuição osmótica natural. Isso implica em alteração fisiológica para que os espermatozoides adquiram motilidade (CHEN et al., 2011). Além disso, os espermatozoides passam por estresses adicionais, por exemplo: durante a criopreservação com a adição e remoção de agentes crioprotetores; e com a congelação e descongelação de palhetas (OLDENHOF et al., 2013).

O teste de resistência osmótica, ou teste hiposmótico (HOST), consiste em teste de laboratório simples e de baixo custo usado para avaliar a integridade funcional da membrana do espermatozoide (ZUBAIR et al., 2013). Quando exposta à solução hiposmótica, a célula espermática se expande com o influxo de fluidos, predominantemente na região da cauda e membrana intacta, na tentativa de atingir o equilíbrio osmótico. Este fluxo de fluido aumenta o volume do espermatozoide, causando “inchaço” nas membranas, fazendo com que a cauda do espermatozoide se enrole, alteração facilmente observável em microscópio (MANGOLI et al., 2011). A habilidade do espermatozoide edemaciar a cauda durante condições hiposmóticas é um indicador de espermatozoide funcional. Aqueles que não apresentam edemaciamento de cauda podem estar associados a disfunções das proteínas da cabeça, peça intermediária e cauda (ZUBAIR et al., 2013). Devido a grande importância da membrana plasmática no processo de fertilização, deve-se ter atenção e cuidado na realização do teste.

1.2.3.5 Morfologia espermática

A identificação da morfologia espermática é importante devido ao potencial de fertilização do oócito (OBERLENDER et al., 2012). Levando em consideração que a espermatogênese e a maturação espermática consistem em processos dinâmicos envolvendo o envelopamento e replicação de DNA, é provável que qualquer problema hereditário ou ambiental possa refletir na produção de espermatozoides anormais.

Existem cerca de 25 variantes diferentes em anormalidades morfológicas de espermatozoides bovinos, abrangendo alterações no acrossoma, na cabeça, peça intermediária e cauda, sendo mais frequente as anormalidades denominadas: cabeça destacada ou pequena, cauda enrolada ou quebrada e gota citoplasmática (ENCISO et al., 2011).

Os defeitos de espermatozoides bovinos podem ainda ser diferenciados em defeitos de tipo maior e menor. A classificação é baseada na relação do defeito com a fertilidade, sendo que os defeitos maiores prejudicariam a fertilização, enquanto os defeitos menores não indicariam necessariamente problemas na espermatogênese (BLOM, 1973; ENCISO et al., 2011).

As anormalidades espermáticas podem ser classificadas de acordo com a origem, sendo subdivididas em defeitos primários, secundários e terciários. Os defeitos primários consistem naqueles que se originam no epitélio seminífero durante a espermatogênese; os secundários são defeitos que se originam distalmente ao epitélio seminífero nas vias intra e

extratesticulares durante o armazenamento e ejaculação; e os defeitos terciários são aqueles originados pela manipulação dos espermatozoides após ejaculação (LAGERLOF, 1934).

A avaliação morfológica espermática é realizada utilizando-se esfregaços corados, como rosa de Bengala. Para preparar a amostra deve-se homogeneizar o sêmen com rosa bengala na proporção de 1:1, e colocar 10µL sobre lâmina de microscopia e cobrir com lamínula, avaliando 200 espermatozoides em objetiva de 100x com óleo de imersão em microscópio de campo claro (MARTINS et al., 2016).

Deve ser contado apenas um defeito por célula. Quando existir mais de um defeito na mesma célula, deve-se registrar o defeito maior em relação ao menor e o de maior frequência (FRENEAU, 2011). A alta frequência de espermatozoides morfolologicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade (ARRUDA et al., 2011).

1.2.3.6 Teste de termoresistência

O teste de termoresistência, juntamente com a motilidade e vigor são importantes avaliações e consistem nos testes mais utilizados por profissionais durante a criopreservação de sêmen (PADRIK et al., 2012). Esse teste simula o tempo do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea a 38°C por longo período e sua motilidade após passar pelo estresse mensurado. Apesar dos espermatozoides serem transportados rapidamente para o oviduto, eles aguardam a ovulação por várias horas. Após prolongado tempo, somente os espermatozoides com metabolismo funcional, demonstrando adequada motilidade estão aptos a fertilizar (SCHULZE et. al, 2019).

REFERÊNCIAS

ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA, J. C. N.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. **Ciência animal brasileira**, v. 15, n. 1, p. 32- 37, 2014.

ANSARI, MS, RAKHA, BA, MALIK, MF, ANDRABI, SMH, ULLAH, N, IQBAL, R. Effect of cysteine addition to the freezing extender on the progressive motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 36-41, 2014.

ARIAS, M.E.; ANDARA, K.; BRIONES, E.; FELMER, R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. **Reproductive Biology**, v.17, n.2, p.126-132, 2017.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIME, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145- 151, 2011.

ÁVILA, A. A.; SIDER, L. H.; VERAS, A. K. A.; PINHEIRO, R. P.; OLIVEIRA, M. L. M.; SILVA, P. A. F.; SOUSA, S. D.; ANDRIOLI, A. Uso da técnica de swim-up para a remoção do Vírus da Artrite Encefalite Caprina do sêmen de reprodutores infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n.1, p. 94- 102, 2015.

BAILEY, J. L. Factors regulating sperm capacitation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, n. 5, p. 334-348, 2010.

BARBOSA, L. M.; KANAZAWA, M. Y.; PERES, A. R.; SOUZA, F. F. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros *post- mortem*. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v. 19, n. 3, p. 190- 194, 2012.

BERGSTEIN-GALAN, T. G.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; BICUDO, S. D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 3, p. 659- 664, 2017.

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

BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 899-905, 2000.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk veterinær medicin**, v.25, p.383-391, 1973.

BREITBART, H. Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 49, n. 3, p. 1-7, 2003.

CARVALHO, J. O. **Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. 2013. 98p. Tese (Doutorado- Escola Superior de Agricultura) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479- 488, 2007.

CESARI, A, KAISER, GG, MUCCI, N, MUTTO, A, VINCENTI, A , FORNÊS, MW, ALBERIO, RH. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm

selection in bovine embryos production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1185-1193, 2006.

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

CHEN, Q.; PENG, H.; LEI, L.; ZHANG, Y.; KUANG, H.; CAO, Y.; SHI, Q.; MA, T.; DUAN, E. Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. **Cell research**, v. 21, n. 6, p. 922, 2011.

CHO, B. S.; SCHUSTER, T. G.; ZHU, X.; CHANG, D.; SMITH, G. D.; TAKAYAMA, S. Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile Sperm. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1671-1675, 2003.

CLUTTON, G.; MOLLAN, K.; HUDGENS, M.; GOONETILLEKE, N. A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker[®] Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry. **Cytometry Part A**, v.95, n.4, p.450-454, 2018.

COLLINS, J. A.; BARNHART, K. T.; SCLEGEL, P. N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 4, p. 823-831, 2008.

CUNHA, A. T. M.; FARIA, O. A. C.; GUIMARÃES, A. L. S. Bovine Sperm Capacitation: Physiological Changes and Evaluations. **JSM In Vitro Fertilization**, v.2, n.1, 2017.

DISSE, D. M.; LAND, J. A. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 6, p. 719-733, 2011.

DUSTE, S.W.; YUSOF, N. A. Microfluidics-Based Lab-on-Chip Systems in DNA-Based Biosensing: Na Overview. **Sensors**, v.11, n. 6, p. 5754- 5768, 2011.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J. L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 76, p. 23- 32, 2011.

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

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGUINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154- 159, 2012.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p. 160-170, 2011.

GARCIA-HERREROS, M.; LEAL, C. L. V. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 6, p. 338- 347, 2014.

GLAZAR, A. I. Assessment of Sperm Mitochondrial Function: JC-1 and Rhodamine 123. In: DASCNIO, J. **Equine Reproductive Procedures**. Iowa: Blackwell, 2014, p. 486- 487.

GRAVANCE, C. V.; GARNER, D. L.; BAUMER, J.; BALL, B. A.; Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC- 1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691 1703, 2000.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 108, n. 1, p. 1- 22, 2003.

HUANG, H. Y.; FU, H. T.; TSING, H. Y.; HUANG, H. J.; LI, C. J.; YAO, D. J. Motile human sperm sorting by and integrated microfluidic system. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnonology**, v. 5, n. 3, p. 1- 6, 2014.

HUANG, H. Y.; HUANG, P. W.; YAO, D. J. Enhanced efficiency of sorting sperm motility utilizing a microfluidic chip. **Microsyst Technonology**, v. 23, p. 305- 312, 2017.

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

KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V.R.; ARANGASAMY, A.; KASTELIC, J. P. Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. **Theriogenology**, v.89, p. 162- 168, 2017.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 117-121, 2007.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; SOLOY, E.; KANEKO, H. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 615- 623, 1998.

KLIONSKY, D.J.; ABDALLA, F. C.; ABELIOVICH, H.; ABRAHAM, R. T.; ACEVEDO-ARZENA, A.; ADELI, K. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v.8, n. 4, p. 445-544, 2012.

KO, Y. J.; MAENG, J. H.; LEE, B. C.; LEE, S.; HWANG, S. Y.; AHN, Y. Separation of Progressive Motile Sperm from Mouse Semen Using On-chip Chemotaxis. **Analytical Sciences**, v.28, n. 1, p. 27-32, 2012.

KOYAMA, S.; AMARIE, D.; SOINI, H. A.; NOVOTNY, M. V.; JACOBSON, S. C. Chemotaxis Assays of Mousa Sperm on Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 10, p. 3354- 3359, 2006.

LAGERLOF, N. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica (Supplement 19), 1934.

LEE, H. L.; KIM, S. H.; JI, D. B.; KIM, Y. J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249- 255, 2009.

LI, H.; HUNG, P.; SUAREZ, S. S. Ejaculated Mouse Sperm Enter Cumulus Oocyte Complexes More Efficiently In Vitro than Epididymal Sperm. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-13, 2015.

LI, J.; NING, B.; CAO, X.; LUO, Y.; GUO, L.; WEI, G.; LIU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; WU, R.; LI, Y. Separation of motile sperm for in vitro fertilization from frozen-thawed bull semen using progesterone induction on a microchip. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 52-59, 2016a.

LI, J.; ZHU, S.; HE, X.; SUN, R.; HE, Q.; GAN, S.L.; FUNAHASHI, H.; LI, Y. Application of a microfluidic sperm sorter to in vitro production of dairy cattle sex-sorted embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1211-1218, 2016.

LOPEZ-GARCIA, M. D. C.; MONSON, R. L.; HAUBERT, K.; WHEELER, M. B.; BEEBE, D. J. Sperm motion in a microfluidic fertilization device. **Biomedical Microdevices**, v. 10, n. 5, p. 709-718, 2008.

MALVEZZI, H. SHARMA, R.; AGARWALL, A.; ABUZENADAH, A. M.; ABU-ELMAGD, M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 121, p. 1-7, 2014.

MANGOLI, V.; MANGOLI, R.; DANDEKAR, S.; SURI, K.; DESAI, S. Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 631- 634, 2011.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v. 65, n. 3, p. 471-485, 2006.

MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Atlas de morfologia espermática bovina. 1º Edição. Brasília: **EMBRAPA/DF**, 2016. 100p.

MORRELL, J. M.; KUMARESAN, A.; JOHANNISSON, A. Practical implications of sperm selection techniques for improving reproduction. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 572- 580, 2017.

MOSCATELLI, N.; SPAGNOLO, B.; PISANELLO, M.; LEMMA, E. D.; VITTORIO, M.; ZARA, V.; PISANELLO, F.; FERRAMOSCA, A. Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17931, 2017.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, 2006.

MUGHAL, DH, IJAZ, A, YOUSAF, MS, WADOOD, F, FAROOQ, U, MAHMOOD, AS, RIAZ, A. Effect of osmotic pressure on spermatozoa characteristics of cryopreserved buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 274-277, 2018.

NAGATA, M. P. B.; ENDO, K.; OGATA, K.; YAMANAKA, K.; EGASHIRA, J.; KATAFUCHI, N.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; GOTO, Y.; SAKATANI, M.; HOJO, T.; NISHIZONO, H.; YOTSUSHIMA, K.; TAKENOUCHI, N.; HASHIYADA, Y.; YAMASHITA, K. 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**, v. 115, n. 14, p. 3087-3096, 2018.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414- 421, 2010.

NOSRATI, R.; VOLLMER, M.; EAMER, L.; SAN GABRIEL, M. C.; ZEIDAN, K.; ZINI, A.; SINTON, D. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. **Lab Chip**, v. 14, n. 6, p. 1142- 1150, 2014.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIMO, M. G.; SILVA, A. C.; PEREIRA, L. J.; MUZZI, R. A. L. Comparison of two different methods for evaluating boar semen morphology. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 44, n. 2, p. 201- 205, 2012.

OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 3, p.1-11, 2013.

PADRIK, P.; HALLAP, T.; KAART, T.; BULITKO, T.; JAAKMA, U. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. **Czech Journal Animal Science**, v. 57, n. 10, p. 490-497, 2012.

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

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of imaging flow cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, p. 99-103, 2015.

PIRES, A. L. R.; MORAES, A. M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 12, 2015.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008, p. 57-82.

REVELL, S. G.; MRODE, R. A. . An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, v. 36, n.1-2, p.77–86, 1994.

REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M.A. Characterization and Identification of Epididymal Factors That Protect Ejaculated Bovine Sperm During In Vitro Storage. **Biology of Reproduction**, v.66, n.1, p.159-166, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, n. 1, p. 138-146, 2007.

SAID, T. M.; LAND, J. A. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 6, p. 719-733, 2011.

SAMUEL, R, FENG, H, JAFEL, A, DESPAIN, D, JENKINS, T, GALE, B. Microfluidic—based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. **Translational Andrology and Urology** 2018; 7:336-347.

SANO, H.; MATSUURA, K.; NARUSE, K.; FUNAHASHI, H. Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration. **Theriogenology**, v. 74, p. 863- 870, 2010.

SATI, L.; BENNETT, D.; JANES, M.; HUSZAR, G. Next day determination of ejaculatory sperm motility after overnight shipment of semen to remote locations. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.32, n.1, p.117-125, 2015.

SCHENDZIELORZ, P.; FROELICH, K.; RAK, K.; GEHRKE, T.; SCHERZAD, A.; HAGEN, R.; RADELOFF, A. Labeling adipose-derived stem cells with Hoechst 33342: Usability and effects on differentiation potential and DNA damage. **Stem Cells International**, 2016.

SCHULZE, M.; JAKOP, U.; JUNG, M.; CABEZÓN, F. Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.127, n.15, p.15-20, 2019.

SHIROTA, K.; YOTSUMOTO, F.; ITOH, H.; OBAMA, H.; HIDAKA, N.; NAKAJIMA, K.; MYAMOO, S. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. **Original article: Andrology**, v. 105, n. 2, p. 315- 321, 2016.

SIMON, L.; MURPHY, K.; SHAMSI, M. B.; LIU, L.; EMERY, B.; ASTON, K. I.; HOTALING, J. CARRELL, D. T. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. **Human reproduction**, v. 29, n. 11, p. 2402- 2412, 2014.
SIQUEIRA, JB, GUIMARÃES, JD, COSTA, EP, HENRY, M, TORRES, CAT, SILVA, MVGB, SILVEIRA, TS. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.36, p.387-395, 2007.

SMITH, G. D.; TAKAYAMA, S. Gamete and embryo isolation and culture with microfluidics. **Theriogenology**, v. 68, p. 190- 195, 2007.

STEINHAUSER, C.B.; GRAHAM, J. K.; LENZ, R.W.; SEIDEL JUNIOR, G. E. Removing seminal plasma improves bovine sperm sex- sorting. **Andrology**, v.4, n.6, p. 1131-1137, 2016.

STIEFEL, P.; SCHMIDT-EMRICH, S.; MANIURA-WEBER, K.; REN, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 36, 2015.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1637-1640, 2006.

TSAI, V. F. S.; CHANG, H. C.; HSIEH, J. T.; WO, A. M. Application of microfluidic technologies to the quantification and manipulation of sperm. **Urological Science**, v. 27, p. 56- 59, 2016.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S. Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: Reflexos de um período de turbulências. **Jornal o embrião**, v. 58, p. 6- 10, 2016.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Revista Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55- 65, 2012.

VOGLER, CJ, SAACKE, RG, BAME, JH, DEJARNETT, JM, MCGILLIARD, ML. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science** v.74, p.3827-3835, 1991.

WEISS, R. R.; MURADAS, P.R.; GRANEMAN, L.C.; CEZINANDE, M. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Animal Reproduction Science**, p. 356-356, 2008.

WHEELER, M. B.; RUBESSA, M. Integration of microfluidics in animal *in vitro* embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v. 33, n. 4, p. 248-256, 2017.

YUE, Y., HUO, F., NING, P., ZHANG, Y., CHAO, J., MENG, X., & YIN, C. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of Cys in living cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 8, p. 3181-3185, 2017.

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**, v. 115, n. 33, 2018.

ZHANG, Y.; XIAO, R.R.; YIN, T.; ZOU, W.; TANG, Y.; DING, J.; YANG, J. Generation of Gradients on a Microfluidic Device: Toward a High-Throughput Investigation of Spermatozoa Chemotaxis. **Plos one**, v.10, n.11, 2015.

ZUBAIR, M.; LODHI, L.; AHMAD, E.; MUHAMMAD, G. Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of sêmen of bull. **Jounal of Entomology and Zoology Studies**, v.1, n. 6, p. 124-128, 2013.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Desenvolver dispositivo microfluídico com material de menor custo para realizar seleção de espermatozoides bovinos por quimiotaxia.

1.3.2 Objetivos específicos

- Testar toxicidade de dispositivo desenvolvido a partir de silicone alternativo ao descrito na literatura;
- Avaliar a eficácia da técnica na seleção de espermatozoides e comparar com gradiente de Percoll;
- Avaliar possíveis efeitos quimiotáticos de espermatozoides em diferentes meios apresentados;
- Avaliar o impacto da técnica na motilidade, morfologia e viabilidade espermática.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE SILPURAN® PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO À BASE DE SILICONE SILPURAN® PARA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

RESUMO – O uso de sistemas microfluídicos está em ascensão em diversas áreas, inclusive na reprodução. Entretanto, o material utilizado para confecção ainda pode ser considerado de custo relativamente alto. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver novo dispositivo microfluídico, com utilização do silicone Silpuran®, e testar sua viabilidade em espermatozoides bovinos. Para isso, foram utilizados 10 pares de epidídimos para obtenção das amostras, as quais foram avaliadas no momento inicial e após 60, 120 e 180 min pelo teste de termoresistência e outros 10 pares para o teste de seleção espermática. Avaliou-se os parâmetros de cinética dos espermatozoides com a utilização do sistema de análise computadorizada (CASA), a morfologia por meio da homogeneização com rosa bengala, e a integridade e viabilidade da membrana plasmática, utilizando o teste hiposmótico e microscopia fluorescente com a utilização de sondas, respectivamente. Os dados foram comparados utilizando-se o teste de Mann-Whitey. Os parâmetros de MT, MP, VSL, VCL e VAP dos espermatozoides epididimários depositados no dispositivo foram superiores aos do controle. As demais avaliações para espermatozoides epididimários mantiveram-se equivalentes entre controle e tratamento. O uso do silicone Silpuran® na confecção dos dispositivos microfluídicos não foi tóxico para as células e apresentou resultados satisfatórios em relação ao controle. Além disso, consiste em material de custo inferior aos demais utilizados na literatura.

PALAVRAS-CHAVES: Dispositivo microfluídico, Epidídimo, Polidimetilsiloxano, Seleção espermática, Toxicidade.

Introdução

O uso de biotecnologias reprodutivas em sistemas de criação de bovinos está em constante crescimento e vem estabelecendo técnicas que buscam o aumento da produção e o melhoramento genético (WHEELER; RUBESSA, 2017). A produção *in vitro* de embriões ganhou destaque no cenário atual, representando aproximadamente 66% dos embriões transferidos no mundo, sendo o Brasil o maior produtor por fertilização *in vitro* (VIANA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2014). Dentre os aspectos responsáveis para se alcançar o sucesso na fertilização, no desenvolvimento e na confirmação da prenhez está a seleção de espermatozoides (SAID; LAND, 2011; NOSRATI et al., 2014; VICENTE et al., 2012).

A seleção espermática consiste em separar os espermatozoides viáveis e móveis do plasma seminal, em busca de concentrar o maior número de espermatozoides móveis em um volume relativamente inferior (HENKEL; SHILL, 2003; GARCÍA-HERREROS; LEAL, 2014; MORRELL et al., 2017). Os procedimentos de separação de espermatozoides são capazes de melhorar significativamente a qualidade dos espermatozoides, melhorando sua motilidade progressiva e morfologia (GUIMARÃES, 2014).

Dentre os métodos mais utilizados atualmente para seleção espermática estão as técnicas de swim-up e gradiente de Percoll[®]. Essas dependem da migração ou sedimentação, respectivamente, dos espermatozoides para realizar a separação. Entretanto, podem apresentar limitações devido à possibilidade de causarem redução na motilidade ou danos devido à centrifugação, induzir a fragmentação do DNA, bem como, aumentar o número de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MALVEZZI et al., 2014; NOSRATI, 2014).

A técnica ideal para seleção espermática deve ser rápida, fácil e de baixo custo, isolar a maior quantidade de espermatozoides móveis, não causar danos ou alterações fisiológicas a estes e que elimine espermatozoides mortos (HENKEL; SHILL, 2003). As técnicas atuais mais utilizadas ainda causam bastantes danos aos espermatozoides e, geralmente, os reagentes apresentam elevado custo. Portanto, há necessidade de se pesquisar métodos mais avançados para seleção de espermatozoides (SAID; LAND, 2011).

Quando comparadas com técnicas convencionais de seleção espermática, os dispositivos baseados em tecnologias microfluídicas fornecem um dos métodos mais apropriados para separar de forma rápida os espermatozoides viáveis e móveis, mantendo a integridade do DNA sem causar danos mecânicos à célula (SMITH; TAKAYAMA, 2007; SANO et al., 2010). Essa técnica de seleção geralmente se baseia no bombeamento ativo por equipamentos externos, como com auxílio de seringa, ou por bombeamento passivo, por pressão hidrostática (LI et al., 2016).

Alguns materiais e técnicas foram utilizados para confecção de dispositivos microfluídicos, como o uso de polidimetilsiloxano (PDMS) associado ao vidro (LI et al., 2016; NAGATA et al., 2018). Porém, embora se apresentem como alternativas a baixo custo, alguns destes produtos não se enquadrariam na realidade de muitos profissionais autônomos e o planejamento de novos designs e uso de novos materiais ideais para produção em massa consiste em importante linha de pesquisa.

Com isso, a utilização do silicone Silpuran[®] (Polisil Indústria e Comércio de Silicone LTDA, São Paulo) pode se apresentar como uma opção. O Silpuran[®] 2420 A/B consiste em polímero de polidimetilsiloxano (PDMS) que compreende dois componentes (A e B) com grupos funcionais e auxiliares para reticulação adicional mediada por um catalisador de platina que se propõe a produzir produtos transparentes (PIRES; MORAIS, 2015; STIEGHORST; DOLL, 2018).

Apesar dos sistemas microfluídicos apresentarem evolução há algum tempo e demonstrarem diversas aplicações, ainda é necessário mais estudo para aumentar o

potencial da técnica para seleção de espermatozoides e torná-la comercializável (SAMUEL et al., 2018). Com isso, objetivou-se criar um dispositivo microfluídico com material de baixo custo e que seja atóxico para espermatozoides de bovinos e realizar a seleção de espermatozoides epididimários, testando diferentes soluções quimioatrativas.

Material e métodos

Comitê de ética

Considerando que os ovários e testículos utilizados no estudo foram provenientes de abatedouro, não houve confronto com as normas éticas preconizadas pela lei 11794/2008 e está amparada pela Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA (Capítulo VI; item 6.1.10, sub-item B-II).

Produtos químicos

Todos os produtos químicos utilizados foram da Sigma- Aldrich, salvo indicação em contrário.

Local de coleta e processamento

Foram utilizados 10 complexos testículos-epidídimos (CTEs) e ovários de bovinos sexualmente maduros, coletados no Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró (AFIM). As gônadas foram transportadas a 37°C, no tempo máximo de 30 min, até o Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais (TRIMA), localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró/RN. Para os ovários, utilizou-se meio constituído de solução salina 0,9% (NaCl) acrescido de penicilina (0,05 mg/mL).

As análises no sistema computadorizado de sêmen foram realizadas no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da UFERSA. As avaliações de viabilidade em microscópio de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Biologia Tecidual e do Desenvolvimento (UFERSA).

Desenho e confecção do dispositivo microfluídico

O dispositivo foi inicialmente desenhado no Coreldraw em um quadrado de 2,4 cm com um reservatório central de 5 mm de diâmetro e interligado por canais equidistantes (4mm x 2mm x 0,5mm) a quatro reservatórios idênticos (3mm) (Figura 1). O desenho foi

exportado para o software da máquina de corte a laser Triumph Laser (modelo TR-1390), após o qual foram obtidos os moldes negativos.

Para confecção da placa foi utilizado silicone Silpuran[®] 2420 A/B, correspondente respectivamente à platina e ao agente catalizador. Para se alcançar a textura desejada utilizou-se a proporção de 40:60, respectivamente. O pré-polímero de líquido foi cuidadosamente depositado sobre o molde mestre e curado a temperatura ambiente por 24 h para posterior utilização (Figura 2).

Figura 1 – Esquema de dispositivo microfluídico desenvolvido com dimensões utilizadas para reservatório central, reservatórios de saída e trajeto entre reservatórios.

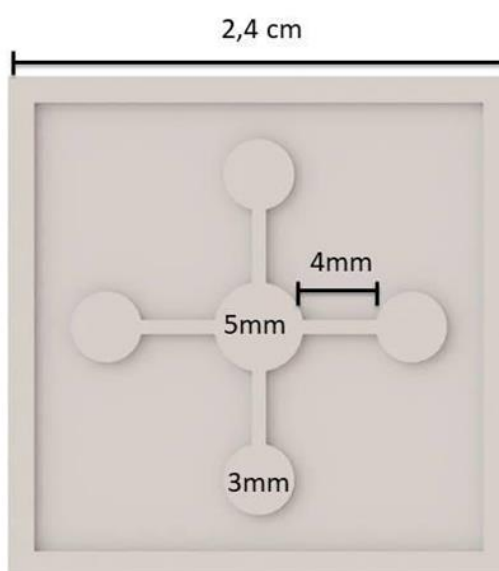
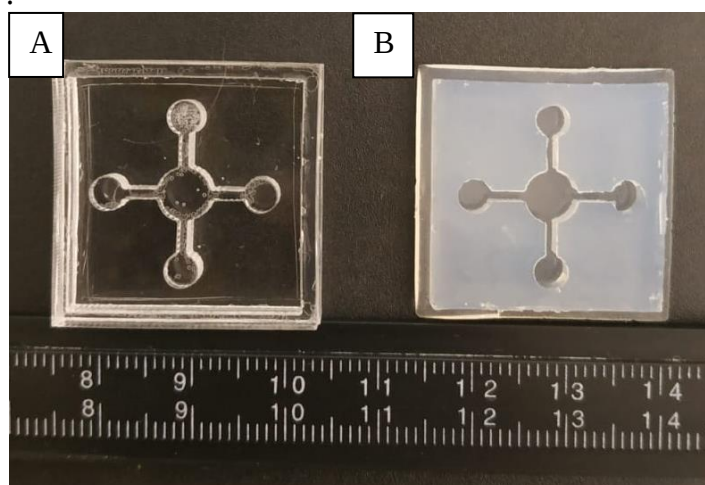


Figura 2- Molde mestre do dispositivo (A) e confecção de réplica final (B) com o uso do silicone Silpuran[®].



Origem dos espermatozoides

Espermatozoides epididimários

Com o auxílio de lâmina de bisturi nº 10 e pinça hemostática curva de 14 cm, a cauda do epidídimo e ducto deferente foram isolados das demais estruturas, sendo lavados e armazenados em temperatura de 8,5°C em solução salina 0,9%, até o momento da sua utilização, não ultrapassando 3 horas. A recuperação dos espermatozoides foi realizada por meio da técnica de flutuação, que consistiu na incubação da cauda do epidídimo seccionada em solução salina 0,9% a 37,5° por 5 minutos. Foram realizados cortes na cauda do epidídimo e após 5 minutos recuperaram-se os espermatozoides. Em seguida a amostra foi depositada em tubo cônico plástico de 15 mL e mantida em banho-maria por 15 minutos.

Preparação de oócitos

Foram aspirados folículos com agulha 21 G acoplada a seringa de 10 mL. O fluido permaneceu por 10 min em tubo cônico plástico para sedimentação. O pellet formado foi transferido para placa de Petri e a seleção foi realizada em condições estéreis sob fluxo laminar com auxílio de estereomicroscópio. Os oócitos selecionados foram lavados em meio TALP-HEPES suplementado com 3mg/mL de BSA, 0,2mM de piruvato de sódio e 50 µg de sulfato de gentamicina. Os complexos cumulus-oócito (CCOs) considerados de grau I e II (LONERGAN et al., 1994) foram destinados à maturação *in vitro*.

Os CCOs selecionados para MIV foram lavados três vezes em meio para maturação TCM 199, acrescido de 0,2 mM de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 10% de soro fetal bovino (SFB), 20 µg/mL de FSH/LH e 100µM de Cisteamina. Posteriormente, as estruturas foram transferidas para gotas de 100 µl do meio de maturação sob óleo mineral. Os CCOs foram maturados durante 24h a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Delineamento experimental 1

Avaliação de toxicidade

Para avaliar a toxicidade do dispositivo microfluídico, utilizou-se o teste de termoresistência lento (TTL) preconizado por Vogler et al. (1991), com modificações de Siqueira et al. (2007). As amostras de sêmen foram distribuídas em tubo estéril de poliestireno e no dispositivo microfluídico. Ambas foram incubadas por 3 horas a 37,5°C. As amostras foram avaliadas no momento inicial e após 60, 120 e 180 min.

Delineamento experimental 2

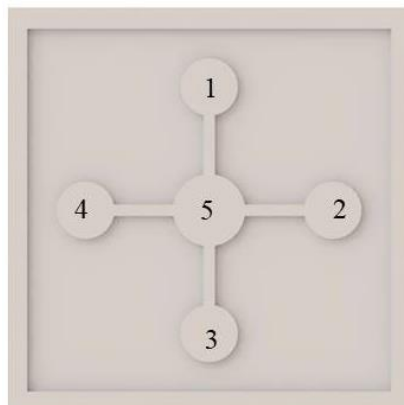
Teste de seleção espermática

Inicialmente, o dispositivo vazio foi disposto em placa de Petri, em sistema de câmara úmida, e incubado por 10min. O ambiente foi ajustado à temperatura de 37,5°C, com objetivo de equilibrar termicamente o dispositivo em ambiente adequado às células, reduzir a probabilidade de formação de bolhas quando o dispositivo fosse preenchido e melhorar o fluxo de fluidos dentro do canal (LOPEZ-GARCIA, 2008).

Primeiramente realizou-se avaliações da amostra logo após a recuperação de espermatozoides ou descongelação de palhetas de sêmen, correspondente à avaliação inicial (AI). Foram avaliadas amostras em 3 tipo de meios, Meio MIV em que correspondia a amostra do reservatório apenas com meio MIV; Meio MIV + O, correspondente a amostra com meio MIV + oócitos; e meio MIV + MAP, correspondente a amostra com meio MIV e acetato de medroxiprogesterona à 0,05%. Como controle foi utilizado solução salina 0,9% (SS).

Cada tipo de meio testado e o controle foram depositados em um dos reservatórios de saída e, posteriormente, a amostra de sêmen foi depositada no reservatório central. O reservatório 1 foi preenchido com 50 µl de soro; o reservatório 2 com 50 µl de meio MIV; o reservatório 3 com 45 µl de meio MIV + 3 oócitos maturados com 5 µl do meio de maturação e o reservatório 4 foi preenchido com 45 µl de meio MIV + 5 µl de acetato de medroxiprogesterona. Por último o reservatório central, correspondente ao reservatório 5, foi preenchido com 50 µl de soro + 50 µl de espermatozoides (Figura 3). Após preenchido, o dispositivo foi levado para a incubadora, onde permaneceu por 30 min, seguindo orientações de Li et al., (2016a). Posteriormente, o reservatório central (contendo a amostra residual) foi isolado para que não houvesse mais contato com os reservatórios adjacentes e alíquotas foram retiradas dos reservatórios com amostra inicial (AI), meio MIV, meio MIV acrescido de oócitos maturados (MIV + O), meio MIV acrescido de acetato de progesterona (MIV + MAP), para avaliação dos parâmetros descritos no item 4.9.

Figura 3 – Esquema de distribuição dos meios no dispositivo microfluídico para avaliar a seleção de espermatozoides provenientes do epidídimo e de sêmen descongelado.



Reservatório 1: 50 µl de solução salina a 0,9%; Reservatório 2: 50 µl de meio MIV; Reservatório 3: 45 µl de meio MIV + 3 oócitos maturados e 5 µl do meio de maturação; Reservatório 4: 45 µl de meio MIV + 5 µl de acetato de medroxiprogesterona a 0,05%; Reservatório 5: 50 µl de soro + 50 µl de espermatozoides.

Como controle da técnica utilizou-se o Percoll[®] como método de seleção. Para isso foi realizada a montagem em tubo cônico de plástico com 1 mL de cada um dos gradientes (90% e 45%) e 500 µl da amostra com espermatozoides acima destes. O tubo com a amostra foi centrifugado durante 15 min a 900 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 1mL de solução fisiológica 0,9%. Realizou-se a segunda centrifugação por 5 min a 900 x g desprezando o sobrenadante novamente e ressuspensando o pellet em 1mL de solução fisiológica 0,9% pré-aquecida.

Avaliação espermática

As amostras foram avaliadas no momento inicial e após 60, 120 e 180 minutos. A avaliação da cinética do movimento espermático foi realizada a partir do sistema CASA (Hamilton Thorne IVOS II system, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), configurado previamente para a análise de espermatozoides bovinos (Anexo I). Para tanto, 2µl da amostra foi inserida em lâmina (Lâmina Leja, 4 cavidades, 20µm) previamente aquecida a 37°C. Os parâmetros analisados foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade média da trajetória (VAP); velocidade linear progressiva (VSL); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH); e frequência do batimento flagelar (BCF).

Para avaliar a morfologia espermática utilizou-se a técnica de preparação úmida corada com rosa bengala a 1,5%, na qual homogeneizou-se 5µl da amostra em 5µl do corante. Foram contabilizadas 200 células/lâmina, sob microscopia óptica em aumento de

1000x, classificando-as em células normais e anormais. As anormalidades espermáticas foram pontuadas em: defeitos de cabeça (macro e microcefalia, formato anormal, destacada), de peça intermediária (dobrada, quebrada, espessa) e de cauda (enrolada, fortemente enrolada, dupla, quebrada), não sendo pontuada mais de uma anormalidade por célula espermática (GUIRARDOSI et al., 2017).

A funcionalidade da membrana foi avaliada a partir do teste hiposmótico. Para tanto, 5µl da amostra foi incubada em 45µl de solução de frutose a 150 mOsm/l por 1h a 37°C. Posteriormente foi avaliada em microscópio óptico, em aumento de 400x, contando-se aleatoriamente 100 espermatozoides com caudas enroladas ou não. O percentual de espermatozoides com cauda enrolada foi considerado como apresentando funcionalidade preservada (MARTINS et al., 2012).

Para avaliar a integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial dos espermatozoides, uma alíquota de 10 µl da amostra foi incubada por 10 min a 37°C em 3 µl de Hoechst 33342 e, posteriormente, incubada novamente por 8 min em solução composta pela associação de 2 µl de iodeto de propídio e 5 µl de Mitotracker CMXRos. As amostras foram avaliadas através de microscópio de epifluorescência (x400) contando 200 células. Os espermatozoides marcados em azul (Hoechst 33342) foram classificados com membrana intacta e aqueles totalmente ou parcialmente marcados em vermelho (Iodeto de propídio) foram classificados como não intactos. Células com peça intermediária marcadas em amarelo (MitoTracker) foram classificadas com atividade mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva. Posteriormente, procedeu-se a análise de pressupostos, normalidade e homocedasticidade. Em seguida, foram realizados testes de comparações de médias com o teste de Mann-Whitey. Para todos os testes utilizados nesse trabalho adotou-se o nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 8.0. Para representação gráfica dos dados foram utilizados os recursos do Microsoft Office Excel 2010.

Resultados

Avaliação de toxicidade

Os resultados das avaliações do Sistema de Análise Computadorizada (CASA) para espermatozoides provenientes do epidídimo foram demonstrados na Tabela 1, de acordo com os parâmetros e os tempos de avaliação.

Os espermatozoides incubados no dispositivo microfluídico apresentaram valores superiores para MT (%) aos 120 e 180 min de avaliação e para MP (%), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$) e VAP ($\mu\text{m/s}$), aos 60 e 180 min, quando comparado ao controle, indicando que a utilização do silicone foi satisfatória nestas avaliações.

A MP (%) dos espermatozoides incubados no dispositivo apresentou aumento progressivo com o passar do tempo, chegando a $45,2 \pm 15,5$ aos 180 min. Além disso, a média das amostras do controle foi inferior ($P < 0,05$) aos 60 ($21,1 \pm 10,5$) e 180min ($21,3 \pm 14,0$) de avaliação em relação à média encontrada no dispositivo de silicone, indicando que os espermatozoides obtiveram movimento progressivo quando submetidos à placa. Aos 120min de avaliação as amostras do controle e tratamento apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$) para o parâmetro avaliado.

Os valores superiores ($P < 0,05$) para os parâmetros VCL, VSL e VAP sugerem que os espermatozoides expostos ao dispositivo microfluídico apresentaram maior velocidade de trajeto do que os espermatozoides avaliados no tubo. No grupo controle verificou-se diminuição gradativa ($P < 0,05$) ao decorrer das avaliações para o parâmetro VAP, considerado útil para indicar a qualidade do movimento de espermatozoides.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre controle e tratamento para os parâmetros de LIN, STR, ALH e BCF em relação à amostra inicial e os tempos de avaliações.

Na avaliação morfológica de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo (Tabela 2) observou-se que a maior parte das células foi classificada como normais, apresentando valores próximos ao desejável de 70% (GLORIA et al., 2016). Os defeitos de cauda (AC%) e peça intermediária (AP%) não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os tempos e tratamentos avaliados. Já os defeitos de cabeça (AK%) diferiram ($P < 0,05$) entre controle ($6,4 \pm 10,5$) e tratamento ($11,3 \pm 8,5$) apenas após 180 min de avaliação.

A porcentagem de espermatozoides epididimários viáveis e com atividade mitocondrial diferiu-se ($P < 0,05$) apenas entre amostra inicial e amostra coletada do dispositivo microfluídico após 180 min de avaliação (Figura 4).

Tabela 1 – Média ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo de bovinos submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em placa microfluídica de silicone (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.

	Amostra inicial	Controle			Amostra inicial	Tratamento			Controle x Tratamento		
		60 min	120 min	180 min		60 min	120	180	$C_{60} \times T_{60}$	$C_{120} \times T_{120}$	$C_{180} \times T_{180}$
MT (%)	82,1 $\pm$ 12,8	75,6 $\pm$ 16,5	70,5 $\pm$ 19,5	65,1 $\pm$ 20,6	82,1 $\pm$ 12,8	85,2 $\pm$ 11,9	83,8 $\pm$ 9,7	82,4 $\pm$ 15,9	ns	P = 0,049	P = 0,025
MP (%)	30,9 $\pm$ 12,3	21,1 $\pm$ 10,5	31,5 $\pm$ 15,4	21,3 $\pm$ 14,0	30,9 $\pm$ 12,3	39,1 $\pm$ 12,6	43,3 $\pm$ 14,3	45,2 $\pm$ 15,5	P = 0,005	ns	P = 0,004
VCL (μm/s)	200,1 $\pm$ 52,6	163,1 $\pm$ 36,7	173,9 $\pm$ 41,1	145,7 $\pm$ 21,7	200,1 $\pm$ 52,6	187,5 $\pm$ 22,7	173,3 $\pm$ 26,6	178,0 $\pm$ 19,6	P = 0,015	ns	P = 0,003
VSL (μm/s)	77,3 $\pm$ 16,6	63,3 $\pm$ 12,5	73,9 $\pm$ 14,7	60,8 $\pm$ 12,6	77,3 $\pm$ 16,6	79,7 $\pm$ 9,2	75,3 $\pm$ 13,8	76,5 $\pm$ 7,5	P = 0,008	ns	P = 0,012
VAP (μm/s)	106,3 $\pm$ 24,7 ^a	86,6 $\pm$ 17,8 ^a	94,2 $\pm$ 19,5 ^a	78,4 $\pm$ 13,5 ^b	106,3 $\pm$ 24,7	104,2 $\pm$ 11,6	95,6 $\pm$ 16,8	98,1 $\pm$ 8,8	P = 0,028	ns	P = 0,005
LIN (%)	40,4 $\pm$ 5,1	40,1 $\pm$ 5,0	43,9 $\pm$ 5,4	42,2 $\pm$ 4,9	40,4 $\pm$ 5,1	43,4 $\pm$ 5,9	43,8 $\pm$ 6,2	43,8 $\pm$ 5,9	ns	ns	ns
STR (%)	72,6 $\pm$ 7,0	72,0 $\pm$ 6,3	76,8 $\pm$ 4,9	75 $\pm$ 4,8	72,6 $\pm$ 7,0	75,1 $\pm$ 5,2	76,7 $\pm$ 5,1	76,6 $\pm$ 5,7	ns	ns	ns
ALH (μm)	8,3 $\pm$ 2,1	8,1 $\pm$ 1,4	7,6 $\pm$ 1,8	7,1 $\pm$ 0,8	8,3 $\pm$ 2,1	8,05 $\pm$ 1,4	7,4 $\pm$ 1,2	7,7 $\pm$ 1,1	ns	ns	ns
BCF (Hz)	32,3 $\pm$ 6,5	29,6 $\pm$ 4,6	34,8 $\pm$ 2,8	33,0 $\pm$ 4,8	32,3 $\pm$ 6,5	32,6 $\pm$ 5,3	34,0 $\pm$ 5,8	32,4 $\pm$ 4,6	ns	ns	ns

ab = comparação dos grupos com a amostra inicial, P < 0,05. ns = não significativo, P > 0,05.

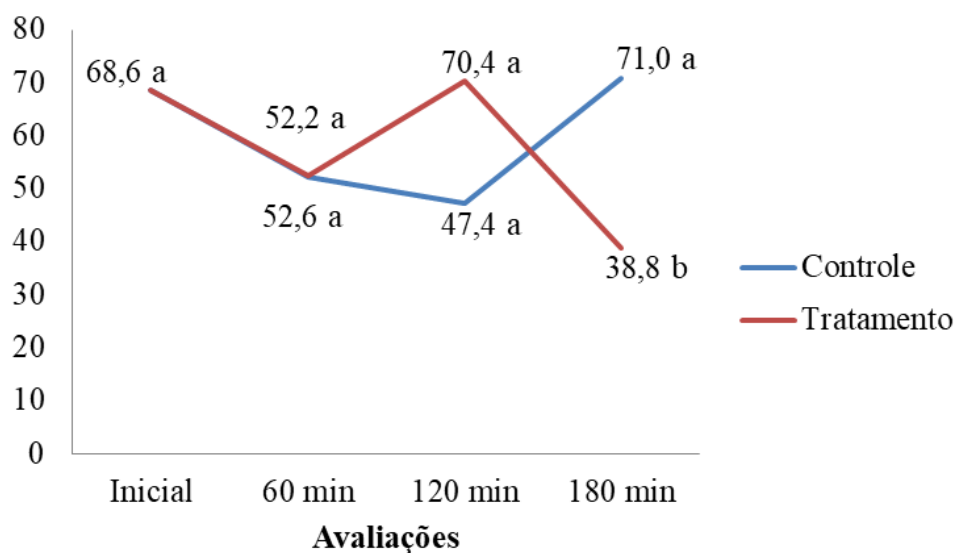
MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = Velocidade Curvilínea; VSL = Velocidade Linear Progressiva; VAP = Velocidade Média da Trajetória; LIN = Linearidade; STR = Retilinearidade; ALH = Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF = Frequência do Batimento Flagelar. $C_{60} \times T_{60}$ = comparação entre os grupos controle e tratamento no tempo de 60 min. $C_{120} \times T_{120}$ = comparação entre os grupos controle e tratamento no tempo de 120 min. $C_{180} \times T_{180}$ = comparação entre os grupos controle e tratamento no tempo de 180 min.

Tabela 2 – Médias ($\pm$ desvio padrão) da avaliação morfológica (%) de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo de bovinos submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min), avaliando-se células normais, defeitos de cauda (AC%), defeitos de peça intermediária (AP%) e defeitos de cabeça (AK%).

Tratamento	Morfologia (%) células normais	AC %	AP %	AK%
Amostra inicial	60,4 $\pm$ 16,2	27,4 $\pm$ 10,4	7,5 $\pm$ 9,3	6,6 $\pm$ 6,9
C60	68,8 $\pm$ 9,4	23,2 $\pm$ 9,9	3,7 $\pm$ 3,0	5,4 $\pm$ 4,5
C120	68,1 $\pm$ 10,9	19,6 $\pm$ 6,0	3,7 $\pm$ 2,8	8,6 $\pm$ 6,9
C180	68,6 $\pm$ 7,8	22,2 $\pm$ 10,2	2,8 $\pm$ 1,9	6,4 $\pm$ 10,5 ^b
T60	63,8 $\pm$ 10,6	25,3 $\pm$ 10,8	6,2 $\pm$ 6,1	4,7 $\pm$ 3,7
T120	62,8 $\pm$ 13,6	25,1 $\pm$ 11,4	3,7 $\pm$ 2,3	8,6 $\pm$ 8,7
T180	63,5 $\pm$ 12,5	21,7 $\pm$ 12,2	3,5 $\pm$ 2,1	11,3 $\pm$ 8,5 ^a

a, b = comparação entre os tratamentos no mesmo tempo, $P < 0,05$.

Figura 4- Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células com viabilidade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo submetidos ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico de silicone (tratamento) em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.



* = não houve diferenças em todas as comparações realizadas, $P > 0,05$.

C0 = Amostra no tempo 0; C60 = Amostra no tubo estéril após 60 min na incubadora; T60 = Amostra no dispositivo de silicone após 60 min na incubadora; C120 = Amostra no tubo estéril após 120 min na incubadora; T120 = Amostra no dispositivo de silicone após 120 min na incubadora; C180 = Amostra no tubo estéril após 180 min na incubadora; T180 = Amostra no dispositivo de silicone após 180 min na incubadora.

Em relação à avaliação de integridade de membrana (%) (Tabela 3), não houve diferença ($P > 0,05$) para espermatozoides epididimários e palhetas de sêmen entre os tempos e grupos avaliados.

Tabela 3 – Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células espermáticas bovinas, com membrana plasmática íntegra, provenientes da cauda do epidídimo e de palhetas de sêmen descongeladas submetidas ao teste de termoresistência em tubo estéril de poliestireno (controle) e em dispositivo microfluídico de silicone (tratamento) e em diferentes tempos (60, 120 e 180 min) de incubação.

Amostras	Amostra inicial	Time 60		Time 120		Time 180	
		Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Epidídimo	83,9 $\pm$ 9,3	83,7 $\pm$ 5,4	80,4 $\pm$ 5,4	81,8 $\pm$ 4,1	80,8 $\pm$ 7,5	79,5 $\pm$ 6,1	77,8 $\pm$ 5,1

* = não houve diferenças em todas as comparações realizadas, $p > 0,05$.

Teste de seleção espermática

Os dados obtidos para os parâmetros de motilidade espermática, de velocidade (VAP, VCL e VSL), LIN, ALH e BCF de espermatozoides epididimários bovinos, oriundos da análise CASA, estão expressos na Tabela 4.

Os valores de motilidade total variaram de 53,2% a 83,9%, sendo os maiores ($P < 0,05$) observados logo após a colheita (AI), nas amostras que passaram pelo gradiente de Percoll[®] e no meio controle composto por solução salina 0,9%. Os menores valores ($P < 0,05$) foram observados em espermatozoides mantidos no meio MIV + MAP e ao final das análises, na amostra residual (AR).

As médias para velocidade curvilínea (VCL) variaram de 153,0 $\pm$ 29,5% a 204,1 $\pm$ 42,5%. Os maiores valores ($P < 0,05$) foram observados após colheita (AI) e nos meios contendo apenas meio MIV e meio MIV + O. As amostras que passaram pelo gradiente de Percoll[®] apresentaram a menor média ($P < 0,05$) para este parâmetro, bem como para o VSL (66,5 $\pm$ 21,0%) e VAP (84,5 $\pm$ 21,4 %).

As amostras avaliadas do reservatório contendo apenas meio MIV apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) quando comparadas às amostras que passaram pela técnica de Percoll[®] para os parâmetros de VCL, VSL, VAP, LIN e STR. Espermatozoides epididimários coletados do reservatório com meio MIV + oócitos também foram superiores ($P < 0,05$) ao Percoll[®] nas avaliações de VAP, LIN e STR.

Para os parâmetros de MP, ALH e BCF observou-se que os espermatozoides epididimários selecionados no dispositivo apresentaram desempenho semelhante ($P > 0,05$) daqueles selecionados após centrifugação.

Espermatozoides epididimários que foram selecionados a partir do gradiente de Percoll[®] apresentaram médias semelhantes ($P > 0,05$) à amostra residual do dispositivo para os parâmetros de VCL, VSL, VAP, LIN e STR. A avaliação dos parâmetros de cinética de espermatozoides epididimários pode ser considerada satisfatória e promissora para futuras pesquisas.

Em relação à morfologia dos espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo (Tabela 5) submetidos à seleção através do gradiente de Percoll[®], observou-se menor porcentagem de normalidade ($46,2 \pm 9,5$) ($P < 0,05$) em relação à amostra inicial ($67,3 \pm 9,4$) e demais meios (58,1% a 70,6%). Além disso, as amostras avaliadas após a centrifugação assemelharam-se a amostra residual ($P > 0,05$) tanto em relação à porcentagem de células normais, como aos defeitos de cauda.

Tabela 4 – Média ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides bovinos provenientes da cauda do epidídimo e submetidos a seleção espermática através do gradiente de Percoll[®] e no dispositivo microfluídico, avaliando a quimiotaxia por diferentes substâncias (solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
AI	83,9 $\pm$ 12,2 ^a	37,7 $\pm$ 16,4 ^a	182,7 $\pm$ 25,7 ^{abc}	75,7 $\pm$ 15,8 ^b	99,5 $\pm$ 16,6 ^{bc}	42,2 $\pm$ 6,2 ^{bc}	74,4 $\pm$ 6,1 ^b	7,5 $\pm$ 1,1 ^a	36,5 $\pm$ 5,0 ^a
Percoll[®]	78,3 $\pm$ 15,7 ^a	32,5 $\pm$ 18,0 ^a	153,0 $\pm$ 29,5 ^c	66,5 $\pm$ 21,0 ^b	84,5 $\pm$ 21,4 ^c	44,1 $\pm$ 6,2 ^b	76,2 $\pm$ 5,1 ^b	6,6 $\pm$ 0,7 ^a	35,7 $\pm$ 4,4 ^a
SS	82 $\pm$ 22,1 ^a	47,6 $\pm$ 16,1 ^a	204,1 $\pm$ 42,5 ^a	101,7 $\pm$ 22,5 ^a	124,8 $\pm$ 28,3 ^a	49,8 $\pm$ 6,3 ^a	79,4 $\pm$ 4,6 ^{ab}	8,0 $\pm$ 1,6 ^a	33,8 $\pm$ 4,8 ^a
Meio MIV	69,2 $\pm$ 23,9 ^{ab}	41,3 $\pm$ 20,1 ^a	195,8 $\pm$ 47,0 ^{ab}	103,3 $\pm$ 24,1 ^a	122,4 $\pm$ 29,4 ^{ab}	53,4 $\pm$ 7,0 ^a	82,9 $\pm$ 5,8 ^a	7,4 $\pm$ 1,9 ^a	34,9 $\pm$ 5,4 ^a
Meio MIV + O	66,7 $\pm$ 27,2 ^{ab}	40,3 $\pm$ 24,4 ^a	184,6 $\pm$ 45,0 ^{abc}	99,7 $\pm$ 24,4 ^{ab}	115,4 $\pm$ 28,4 ^{ab}	53,8 $\pm$ 7,5 ^a	84,5 $\pm$ 4,7 ^a	7,4 $\pm$ 2,1 ^a	35,1 $\pm$ 7,1 ^a
Meio MIV + MAP	60,7 $\pm$ 17,4 ^b	24,1 $\pm$ 14,7 ^a	151,6 $\pm$ 35,0 ^c	74,2 $\pm$ 22,5 ^b	87,9 $\pm$ 23,7 ^c	47,8 $\pm$ 7,3 ^{ab}	81 $\pm$ 8,5 ^a	6,6 $\pm$ 1,8 ^a	34,9 $\pm$ 7,4 ^a
AR	53,2 $\pm$ 27,3 ^b	28,3 $\pm$ 23,3 ^a	163,3 $\pm$ 46,3 ^{bc}	79,1 $\pm$ 33,8 ^b	95,1 $\pm$ 36,6 ^c	46,9 $\pm$ 9,6 ^{ab}	79,4 $\pm$ 6,9 ^{ab}	7,2 $\pm$ 1,5 ^a	32,8 $\pm$ 5,7 ^a

ab = comparação entre tratamentos (P < 0,05); AI = Amostra logo após a coleta em solução salina 0,9%; Percoll[®] = Amostra após passar pelo gradiente de Percoll[®]; SS = Amostra do reservatório 1 com solução salina 0,9% após 30 min; Meio MIV = Amostra do reservatório 2 com meio MIV após 30 min; Meio MIV + O = Amostra do reservatório 3 com meio MIV + oócitos maturados após 30 min; Meio MIV + MAP = Amostra do reservatório com meio MIV + acetato de medroxiprogesterona após 30 min; AR = Amostra residual do reservatório central após 30 min. MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = Velocidade Curvilínea; VSL = Velocidade Linear Progressiva; VAP = Velocidade Média da Trajetória; LIN = Linearidade; STR = Retilinearidade; ALH = Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF = Frequência do Batimento Flagelar.

Tabela 5 – Médias ($\pm$ desvio padrão) da avaliação morfológica (%) de espermatozoides bovinos provenientes da cauda do epidídimo e submetidos à seleção espermática através do gradiente de Percoll® e em dispositivo microfluídico avaliando-se a quimiotaxia por diferentes meios (solução salina 0,09%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).

Tratamentos	Morfologia (%)			
	Células normais	AC	AP	AK
AI	67,3 $\pm$ 9,4 ^a	27,1 $\pm$ 9,4 ^b	3,1 $\pm$ 1,91 ^a	2,1 $\pm$ 1,7 ^a
Percoll®	49,2 $\pm$ 9,5 ^c	38,5 $\pm$ 7,0 ^a	5,5 $\pm$ 4,4 ^a	5,9 $\pm$ 11,7 ^a
SS	58,1 $\pm$ 11,4 ^{bc}	28,0 $\pm$ 11,5 ^b	6,2 $\pm$ 4,4 ^a	7,7 $\pm$ 8,4 ^a
Meio MIV	62,7 $\pm$ 10,4 ^{ab}	27,4 $\pm$ 9,8 ^b	7,1 $\pm$ 4,0 ^a	2,3 $\pm$ 2,0 ^a
Meio MIV + O	69,2 $\pm$ 11,9 ^a	21,8 $\pm$ 12,3 ^b	6,2 $\pm$ 4,8 ^a	2,6 $\pm$ 2,4 ^a
Meio MIV + MAP	70,6 $\pm$ 8,6 ^a	20,5 $\pm$ 7,9 ^b	5,9 $\pm$ 5,0 ^a	2,1 $\pm$ 3,9 ^a
AR	48,2 $\pm$ 7,2 ^c	40,3 $\pm$ 6,1 ^a	7,4 $\pm$ 3,6 ^a	4,1 $\pm$ 2,2 ^a

ab = comparação entre tratamentos ($P < 0,05$); AI = Amostra logo após a coleta em solução salina 0,9%; Percoll® = Amostra após passar pelo gradiente de Percoll®; SS = Amostra do reservatório 1 com solução salina após 30 min; Meio MIV = Amostra do reservatório 2 com meio MIV após 30 min; Meio MIV + O = Amostra do reservatório 3 com meio MIV + oócitos maturados após 30 min; Meio MIV + MAP = Amostra do reservatório com meio MIV + acetato de medroxiprogesterona após 30 min; AR = Amostra residual do reservatório central após 30 min. AC: Anormalidade de cauda; AP: Anormalidade na peça intermediária; AK: Anormalidade de cabeça.

Na avaliação de integridade de membrana plasmática (Tabela 6) de espermatozoides bovinos provenientes do epidídimo observou-se que as maiores médias corresponderam às amostras logo após colheita (76,4 $\pm$ 6,9%) e após passarem pelo gradiente de Percoll® (73,8 $\pm$ 8,7%). As amostras depositadas no dispositivo microfluídico apresentaram valores menores ($P < 0,05$) e com médias variando de 62,3% a 66,3%.

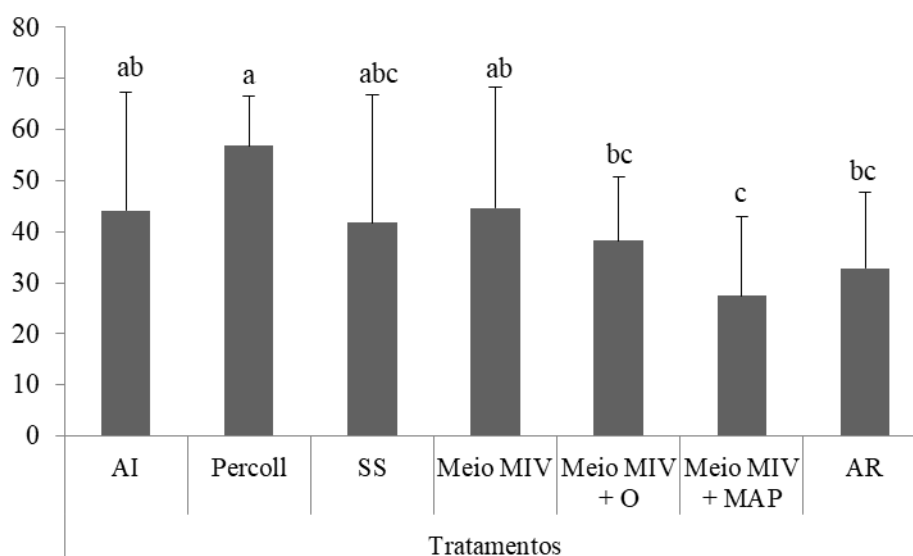
Tabela 6 – Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células espermáticas bovinas, com membrana plasmática íntegra, provenientes da cauda do epidídimo e de palhetas de sêmen descongeladas submetidas ao teste de seleção por gradiente de Percoll® e através de sistema microfluídico, avaliando-se a quimiotaxia de diferentes substâncias (solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).

Tratamentos	Integridade de membrana (%)						AR
	AI	Percoll®	SS	Meio MIV	Meio MIV + O	Meio MIV + MAP	
Epidídimo	76,4 $\pm$ 6,9 ^a	73,8 $\pm$ 8,7 ^{ab}	62,3 $\pm$ 8,3 ^c	66,3 $\pm$ 8,9 ^{bc}	65,6 $\pm$ 6,4 ^c	64,8 $\pm$ 8,4 ^c	64,8 $\pm$ 10,5 ^c

ab = comparação entre tratamentos ($p < 0,05$); AI = Amostra logo após a coleta em solução salina 0,9%; Percoll® = Amostra após passar pelo gradiente de Percoll®; SS = Amostra do reservatório 1 com solução salina 0,9% após 30 min; Meio MIV = Amostra do reservatório 2 com meio MIV após 30 min; Meio MIV + O = Amostra do reservatório 3 com meio MIV + oócitos maturados após 30 min; Meio MIV + MAP = Amostra do reservatório com meio MIV + acetato de medroxiprogesterona após 30 min; AR = Amostra residual do reservatório central após 30 min.

Em relação à avaliação da viabilidade de membrana plasmática (Figura 5) verificou-se que, as amostras logo após colheita ($44,20 \pm 23,22$), as selecionadas pelo gradiente de Percoll[®] ($56,80 \pm 9,70\%$) e as retiradas do meio controle ($41,80 \pm 24,29\%$) apresentaram os maiores valores ($P < 0,05$) em relação aos demais meios e amostra residual.

Figura 5 - Média ($\pm$ desvio padrão) da porcentagem (%) de células com viabilidade de membrana plasmática e atividade mitocondrial de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo submetidos ao teste de seleção por gradiente de Percoll[®] e através de sistema microfluídico, avaliando-se a quimiotaxia de diferentes substâncias (solução salina 0,9%, meio MIV, meio MIV + oócitos e meio MIV + acetato de medroxiprogesterona).



ab = comparação entre tratamentos ($p < 0,05$); AI = Amostra logo após a coleta em solução salina 0,9%; Percoll[®] = Amostra após passar pelo gradiente de Percoll[®]; SS = Amostra do reservatório 1 com solução salina 0,9% após 30 min; Meio MIV = Amostra do reservatório 2 com meio MIV após 30 min; Meio MIV + O = Amostra do reservatório 3 com meio MIV + oócitos maturados após 30 min; Meio MIV + MAP = Amostra do reservatório com meio MIV + acetato de medroxiprogesterona após 30 min; AR = Amostra residual do reservatório central após 30 min.

Os valores médios para os parâmetros de VCL, VSL e VAP foram superiores ($P < 0,05$) para as amostras selecionadas pelo Percoll[®] e meio controle, havendo aumento, inclusive, em relação à amostra recém-coletada ($P < 0,05$). Enquanto isso, a amostra residual apresentou os menores valores ($P < 0,05$).

Em relação à LIN e STR não foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as amostras iniciais, as selecionadas pelo gradiente de Percoll[®] e as que foram testadas no dispositivo microfluídico.

Os valores das amostras selecionadas pelo Percoll[®] e pelo dispositivo microfluídico foram superiores ($P < 0,05$) aos da amostra inicial para BCF. Em relação ao ALH, o meio

MIV + MAP apresentou-se inferior ($P < 0,05$) aos demais meios e amostra inicial, sendo semelhante ($P > 0,05$) à amostra residual.

Observando todos os dados relacionados ao dispositivo microfluídico, verifica-se que os espermatozoides epididimários saíram do poço central e se direcionaram aos poços adjacentes, nos quais continham meio controle, meio MIV, meio MIV + O e meio MIV + MAP, no intervalo de 30 minutos.

Discussão

Os resultados apresentados neste estudo demonstram, a partir de diferentes avaliações, a viabilidade de espermatozoides bovinos que estiveram em contato com dispositivo microfluídico fabricado com Silpuran[®] e fornecem perspectivas para a aplicação do mesmo para outras técnicas de reprodução *in vitro*, inclusive para animais selvagens. Para realização da FIV, a escolha da técnica para seleção de espermatozoides é baseada principalmente na motilidade, pois espermatozoides com melhor motilidade possuem maior capacidade de fertilizar o oócito (KNOWLTON et al., 2015).

Desta forma, após avaliação dos dados confirmou-se que o uso do silicone Silpuran[®] para confecção do dispositivo microfluídico não foi tóxico aos espermatozoides e proporcionou maior ganho de MT e MP para espermatozoides provenientes do epidídimo. Destaca-se que os resultados para os parâmetros de MT e MP aos 180min desta pesquisa foram semelhantes à amostra fresca recém coletada.

Os espermatozoides epididimários avaliados no tubo apresentaram valores de VSL abaixo do preconizado na literatura. Para serem considerados altamente móveis e com motilidade progressiva, os espermatozoides devem apresentar $VSL \geq 70\%$ e $VAP \geq 50\mu\text{m/s}$ (MALAMA et al., 2017).

A razão de área de superfície e volume depositado no dispositivo permite a homogeneidade térmica devido a rápida transferência de calor entre o dispositivo e o fluido contido nesse (CHIU et al., 2017), o que possibilitou preservação das características de motilidade dos espermatozoides epididimários de forma mais adequada ao se comparar com o tubo cônico. Possivelmente, o tubo não foi capaz de dissipar o calor de forma equivalente para toda a amostra.

Supostamente, os valores superiores nos parâmetros de motilidade de espermatozoides epididimários devem-se ao uso do dispositivo microfluídico, o qual permite aumento da superfície na qual os espermatozoides podem nadar em relação ao

tubo, levando a melhor recuperação de espermatozoides móveis da amostra (SAMUEL et al., 2018). Nessa perspectiva, a placa demonstrou ter influência positiva na qualidade dos espermatozoides, além de permitir incorporar diretamente a preparação de amostras no dispositivo.

Os dispositivos microfluídicos consistem em ferramentas promissoras de manipulação de fluidos que permite isolar e analisar microrganismos, como os espermatozoides, mais facilmente quando comparado a métodos tradicionais. Além disso, a microfluídica possibilita manipulação com precisão requintada em pequenas escalas (2 μm – 1mm) e não possui a desvantagem de requerer a centrifugação para isolar espermatozoides (ZAFERANI et al., 2018). Estudos nessa área também podem servir de base para aprimorar e/ou implementar o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas aplicadas a outras espécies domésticas ou silvestres, com potencial para auxiliar na conservação da fauna selvagem.

A seleção de espermatozoides por quimiotaxia pode ser considerada ferramenta poderosa em relação a outras formas de seleção em dispositivo microfluídico. Por exemplo, bombeamento ativo com a utilização de equipamentos externos, que geram fluxo laminar e acabam por carrear também espermatozoides sem motilidade progressiva (LI et al., 2016). A quimiotaxia celular real é o processo em que a célula está continuamente sentindo o poder e a direção dos quimiotáticos e se movendo de acordo com estes. A velocidade quimiotática apresenta aumento até o momento em que os locais de ligação ao receptor estejam saturados sofrendo, posteriormente, uma redução (LI et al., 2017).

Para realização do teste de quimiotaxia no dispositivo microfluídico escolheu-se utilizar solução salina 0,9% como meio controle, já que as amostras iniciais seriam diluídas nessa solução no intuito de evitar influência sobre os parâmetros dos espermatozoides. Além disso, utilizou-se também meio de maturação de oócitos bovino (Meio MIV) composto por TCM 199 suplementado com piruvato de sódio, sulfato de gentamicina, soro fetal bovino, FSH, LH e cisteamina associado a oócitos (Meio MIV + O) e progesterona (Meio MIV + MAP). O meio MIV foi escolhido devido apresentar composição mais rica e serviu de padrão para comparação dos grupos compostos com meio MIV associados aos oócitos e a progesterona.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo confirma-se que o dispositivo microfluídico foi capaz de selecionar espermatozoides epididimários com MT e MP adequados, em relação à técnica de gradiente de Percoll[®]. Espermatozoides com maior motilidade são mais adequados para a fertilização *in vitro* e os dispositivos microfluídicos

são capazes de tornar a técnica ideal para seleção destes espermatozoides (SAMUEL et al., 2018).

Valores mais altos de VCL, VSL e ALH possuem correlação positiva com a fertilidade dos espermatozoides (AMANN, 1989). Nesse trabalho, os espermatozoides epididimários coletados do reservatório com solução salina 0,9% e meio MIV + oócitos maturados apresentaram médias de VCL e VSL superiores ($P < 0,05$) ao Percoll[®] e dentro do intervalo padrão observado para a espécie (RAI et al., 2018). Considerando-se apenas essas variáveis, esses espermatozoides poderiam ser utilizados, com sucesso, em outras técnicas de reprodução assistida, como a FIV.

A maior porcentagem ($P < 0,05$) de anormalidades morfológicas dos espermatozoides epididimários que foram selecionados por gradiente de Percoll[®] em relação aos que foram mantidos no dispositivo microfluídico provavelmente ocorreu devido a uma etapa necessária para realização do gradiente, a centrifugação da amostra (GUIMARÃES et al., 2014; OLIVARES et al., 2019). Já se tratando de viabilidade da membrana plasmática dessas células, não se verificou ($P > 0,05$) influência do uso ou não da centrifugação.

A interação dos espermatozoides com seu microambiente químico é fundamental para avaliar a sensibilidade das células (LI et al., 2017). Possivelmente, devido a não remoção do crioprotetor do sêmen descongelado antes da sua deposição no dispositivo microfluídico, causou efeito negativo na motilidade total e progressiva dos espermatozoides, ficando os valores abaixo do mínimo necessário para ser utilizado em técnicas de reprodução assistida, como na FIV (VARGAS JÚNIOR et al., 2018). Acredita-se que o impacto causado pelos crioprotetores estendeu-se também para a integridade e viabilidade de membrana plasmática dos espermatozoides. Pressupõe-se que para realizar a seleção de espermatozoides provenientes de sêmen descongelado no sistema microfluídico, faz-se necessário a remoção prévia do crioprotetor.

As pesquisas em busca de desenvolverem dispositivos microfluídicos como técnica rotineira estão em ascensão. Diversos estudos foram realizados para se compreender melhor os fatores que podem influenciar a jornada dos espermatozoides após a ejaculação até a fertilização do oócito, como a quimiotaxia, reotaxia (ZAFERANI et al., 2018) e termotaxia.

A seleção de espermatozoides bovinos utilizando a quimiotaxia em dispositivos microfluídicos já foi descrita com a utilização de progesterona (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2015), devido a mesma ser liberada pelas células do *cumulus* do oócito e ser considerada como poderoso quimioatraente para espermatozoides (SMITH et al., 2013). Porém, nos estudos supracitados utilizou-se progesterona sólida (Sigma Aldrich), o que

diferenciou do utilizado nesta pesquisa, devido a maior facilidade de obtenção. Dessa maneira, acredita-se que os espermatozoides não apresentaram atração suficiente pela substância disponível no reservatório.

Considerando o restante dos meios avaliados no dispositivo microfluídico, os espermatozoides epididimários apresentaram preferência pela solução salina 0,9%, pelo meio MIV e meio MIV + oócitos maturados.

Os dispositivos microfluídicos de baixo custo e sem necessidade de equipamentos externos, assim como o dispositivo apresentado nessa pesquisa, possuem mais chances de sucesso na comercialização (KASHANINEJAD et al., 2018). Entretanto, verifica-se ainda a necessidade de reajustar as dimensões e os meios utilizados, em busca de permitir que os espermatozoides possam ser estimulados a nadar para a substância atrativa de forma mais adequada.

Dentre as limitações para o uso de atuais dispositivos microfluídicos está o fato de esses serem fabricados em um tipo de polidimetilsiloxano (PDMS), que mesmo sendo a ideal para prototipagem rápida, apresenta desafios significativos de custo quando se trata de produção em massa (SAMUEL et al., 2018). O presente dispositivo confeccionado é pequeno, fácil de usar, compatível com sistemas de manipulação macroscópica e apresenta baixo custo quando comparada aos demais dispositivos desenvolvidos.

Conclusão

O silicone Silpuran[®] não foi tóxico para espermatozoides bovinos e seu uso na confecção de dispositivo microfluídico apresentou influência positiva na qualidade de espermatozoides epididimários, além de ter menor custo em relação a outros materiais utilizados. O dispositivo microfluídico apresentou resultados promissores para seleção de espermatozoides epididimários de bovinos, os quais apresentaram maior preferência para os meios contendo apenas MIV e meio MIV + O. Para aumentar eficiência do dispositivo criado é necessário realizar modificações nas dimensões deste, a fim de permitir melhor quimioatração espermática.

REFERÊNCIAS

AMANN, RUPERT P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *Journal of andrology*, v.10, n.2, p.89-98, 1989.

BERTOL, MAF, WEISS, RR, KOZICKI, LE, ABREU, ACMR, PEREIRA, JFS, SILVA, JJ. In vitro and in vivo fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18 °C–20 °C).

Theriogenology, v. 86, n. 4, p.1014-1021, 2016.

BERTOL, MAF, WEISS, RR, THOMAZ-SOCCOL, VM KOZICKI, LE, FUJITA, AS, ABREU, RA, GREEN, KT. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. **Brazilian Archives of Biology and Techonology**, v. 56, n. 5, p. 777-783, 2013.

CELEGHINI, ECC, DE ARRUDA, RP, DE ANDRADE, AFC, NASCIMENTO, J, RAPHAEL, CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHIU, DT, MELLO, AJ, CARLO, DD, DOYLE, OS, HANSEN,C, MACEICZYK, RM, WOOTTON, RCR. Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. **Cell Press**, v. 2, n. 2, p. 201-223, 2017.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 424-435, 2010.

CUNHA,ATM, CARVALHO, JO, KUSSANO, NR, MARTINS, CF, MOURÃO, GB; DODE, MAN. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. **Cryobiology**, v.73, n. 3, p. 348-355, 2016.

FELIPE-PÉREZ, YE, JUÁREZ-MOSQUEDA, ML; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, EO, VALENCIA, JJ. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 4, p. 123-130, 2008.

FORERO-GONZALEZ, RA, CELEGHINI, ECC, RAPHAEL, CF, ANDRADE, AFC, BRESSAN, FF, ARRUDA, RP. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154-159, 2012.

GARCÍA-HERREROS, M, LEAL, CLV. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 6, p. 338- 347, 2014.

GLORIA, A, CARLUCCIO,A, WEGHER, L, ROBBE, D, BEFACCHIA, G, CONTRI, A. Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 30, 2016.

GROTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P.E.; KJELLAND, M.E.; FERRÉ, L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-

thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 54, n. 4, p. 655-665, 2019.

GUIMARÃES, A.C.G.; LEIVAS, F.G.; SANTOS, F.W.; SCHWENGBER, E.B.; GIOTTO, A.B.; MACHADO, C.; GONÇALVES, C.G.; FOLCHINI, N.P.; BRUM, D.S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*, v.146, n.3, p.103-110, 2014.

GUIMARÃES, ACG, LEIVAS, FG, SANTOS, FW, SCHWENGBER, EB, GIOTTO, CIU, MACHADO, CGM, GONÇALVES, NP, FOLCHINI, DSB. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*, v. 146, n. 3, p.103-110, 2014.

GUIRARDOSI, MS, FISCHAMAN, ML, JORGE, AE, CHAN, D, CISALE, H. Relationship between morphological abnormalities in commercial bull frozen semen doses and conception rate. *Andrology*, v. 50, n. 3, p.1-5, 2018.

GURLER, H, MALAMA, E, HEPPELMANN, M, CALISICI, O, LEIDING, C, KASTELIC, JP, BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, v. 86, n. 2, p. 562-571, 2016.

HENKEL, RR, SCHILL, W. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, n. 1, p. 108, 2003.

KASHANINEJAD, N.; SHIDDIKY, M. J. A.; NGUYEN, N. T. Advances in Microfluidics-Based Assisted Reproductive Technology: From Sperm Sorter to Reproductive System-on-a-Chip. *Advanced Biosystems*, v.2, n.3, 2018.

KHALIL, WA, EL-HARAIRY, MA, ZEIDAN, AEB, HASSAN, MAE. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 6, n. 1, p. 49-56, 2018.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, n.1, p. 63-67, 2007.

KNOWLTON, SM, SADASIVAM, M., TASOGLU, S. Microfluidics for sperm research. *Cell Press*, v. 33, n. 4, p. 221-229, 2015.

KO, Y.J.; MAENG, J. H.; LEE, B.C.; LEE, S.; HWANG, S. Y.; AHN, Y. Separation of Progressive Motile Sperm from Mouse Semen Using On-chip Chemotaxis. *Analytical Sciences*, v.28, n.1, p.27-32, 2012.

KOH, J.B.Y. The study of spermatozoa and sorting in relation to human reproduction. *Microfluidics and Nanofluidics*, v.18, n.5, p. 755-774, 2015.

LEITE, TG, VALE FILHO, VR, ARRUDA, RP, ANDRADE, AFC, EMERICK, LL, ZAFFALON, FG, MARTINS, JAM, ANDRADE, VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen

evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 31-38, 2010.

LI, H, HUNG, P, SUAREZ, SS. Ejaculated Mouse Sperm Enter Cumulus Oocyte Complexes More Efficiently In Vitro than Epididymal Sperm. **Plos One**, v. 10, n. 5, 2015.

LI, J.; NING, B.; CAO, X.; LUO, Y.; GUO, L.; WEI, G.; LIU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; WU, R.; LI, Y. Separation of motile sperm for in vitro fertilization from frozen-thawed bull semen using progesterone induction on a microchip. **Animal Reproduction Science**, v.172, p.52-59, 2016a.

LI, J.; NING, B.; CAO, X.; LUO, Y.; GUO, L.; WEI, G.; LIU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; WU, R.; LI, Y. Separation of motile sperm for in vitro fertilization from frozen-thawed bull semen using progesterone induction on a microchip. **Animal Reproduction Science**, v.172, p.52-59, 2016.

LI, J.; ZHU, S.; HE, X.; SUN, R.; HE, Q.; GAN, Y.; LIU, S.; FUNAHASHI, H.; LI, Y. Application of a microfluidic sperm sorter to in vitro production of dairy cattle sex-sorted embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1211-1218, 2016b.

LI, P.; DU, X.; HU, Y. Numerical study on the cell motility interacting with the chemical flow in microchannels. **Microfluidics and Nanofluidics**, v.21, n.4, p.62-72, 2017.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, MP.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, n.1, p.48-53, 1994.

MALAMA, E, ZERON, Y, JANETT, F, SIUDA, M, ROTH, Z, BOLLWEIN, H. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. **Theriogenology**, v. 87, -. 79-90, 2017.

MALVEZZI, H, SHARMA, R, AGARWALL, A, ABUZENADAH, AM, ABUEL MAGD, M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 121, 2014.

MARTINS, CF, DRIESSEN, K, COSTA, PM, CARVALHO-NETO, JO, SOUSA, RV, RUMPF, MN, DODE, MN. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 50-57, 2009.

MARTINS, LF, PINHO, RO, SIQUEIRA, JB, DOMENECK, F, NETO, TM, GUIMARÃES, JD. Avaliação da qualidade do sêmen fresco de touros jovens da raça composto tropical Montana e suas correlações com o teste hiposmótico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 192-198, 2012.

MORRELL, JM, KUMARESAN, A, JOHANNISSON, A. Practical implications of sperm selection techniques for improving reproduction. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 572- 580, 2018.

NAGATA, MPB, ENDO, K, OGATA, K, YAMANAKA, K, EGASHIRA, J, KATAFUCHI, N, YAMANOUCI, T, MATSUDA, H, GOTO, Y, SAKATANI, M, HOJO, T, NISHIZONO, H, YOTSUSHIMA, K, TAKENOUCI, N, HASHIYADA, Y, YAMASHITA, K. 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**, v. 115, n. 14, p. 3087-3096, 2018.

NOSRATI, R, VOLLMER, M, EAMER, L, SAN GABRIEL, MC, ZEIDAN, K, ZINI, A, SINTON, D. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 6, p. 1142-1150, 2014.

OLIVARES, C.C.S.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; FONSECA, J.F.; SARAIVA, H.F.R.A.; CÔRTEZ, L.R.; ALFRADIQUE, V.A.P.; BALARO, M.F.A.; OLIVEIRA, R.V.; BRANDÃO, F.Z. Mini-percoll gradient may be used for frozen-thawed sperm selection in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.2, 2019.

OLIVEIRA, LZ, HOSSEPIAN, VFL, LEVENHAGEN, MA, SANTOS RM, ASSUMPCAO TI, JACOMINI, JO, ANDRADE, AFC, ARRUDA, RP, BELETTI, ME. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 267-272, 2011.

PIRES, ALR, MORAES, AM. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 12, p. 1-9, 2015.

QUINN, M.M.; JALALIAN, L.; RIBEIRO, S.; ONA, K.; DEMIRCI, U.; CEDARS, M. I.; ROSE, M. P. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. **Human Reproduction**, v.33, n.8, p.1388-1393, 2018.

RAI, S.; TYAGI, S.; KUMAR, M.; KARUNAKARAN, M.; MONDAL, M.; MANDAL, A.; BEHERA, R. Understanding motility dynamics of crossbred bull spermatozoa when analyzed by Computer Assisted Semen Analyzer (CASA). **Indian Journal of Animal Research**, v.52, n.4, 2018.

SAID, TM, LAND, JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 6, p. 719-733, 2011.

SAMUEL, R, FENG, H, JAFEL, A, DESPAIN, D, JENKINS, T, GALE, B. Microfluidic—based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 3, p. 336, 2018.

SANO, H, MATSUURA, K, NARUSE, K, FUNAHASHI, H. Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration. **Theriogenology**, v.74, n. 5, p. 863- 870, 2010.

SARAGUSTY, J., GACITUA, H., ROZENBOIM, I., ARAV, A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1425-1432, 2009.

SEPÚLVEDA, B. et al. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll?. **Andrologia**, v. 50, n. 3, 2018.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.2-5, 2016.

SIQUEIRA, JB, GUIMARÃES, JD, COSTA, EP, HENRY, M, TORRES, CAT, SILVA, MVGB, SILVEIRA, TS. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 387-395, 2007.

SMITH, GD.; TAKAYAMA, S. Gamete and embryo isolation and culture with microfluidics. **Theriogenology**, v. 68, p. 190-195, 2007.

SMITH, J.F.; SYRITSYNA, O.; FELLOUS, M.; SERRES, C.; MANNOWETZ, N.; KIRICHOK, Y.; LISHKO, P.V. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{2+} channel in a CatSper2-deficient infertile patient. **PNAS**, v.110, n.17, p.6823-6828, 2013.

SON, J.; JAFEK, A.R.; CARRELL, D.T.; HOTALING, J.M.; GALE, B.K. Sperm-like-particle (SLP) behavior in curved microfluidic channels. **Microfluidics and Nanofluidics**, v.23, n.1, p.4-16, 2019.

STIEGHORST, J, DOLL, T. Rheological Behavior of PDMS Silicone Rubber for 3D Printing of Medical Implants. **Additive Manufacturing**, v. 24, p. 217-223, 2018.

TURRI, F, MADEDDU, M, GLIOZZI, TM, GANDINI, G, PIZZI, F. Influence of Recovery Methods and Extenders on Bull Epididymal Spermatozoa Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 712- 717, 2012.

VARGAS JÚNIOR, S.F.; COSTA, V.G.G.; OLIVEIRA, F.C.; GOULARTE, K.L.; HAAS, C.S.; GASPERIN, B.G.; LUCIA JÚNIOR, T. Bovine sperm cell motility after incubation in follicular fluid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 7, p. 866-869, 2018.

VIANA, JHM, SIQUEIRA, LGB, PALHÃO, MP, CAMARGO, LSA. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661-676, 2010.

VICENT, P, UNDERWOOD, SL, DOLBEC, C, BOUCHARD, N, KROETSCH, T, BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 153-165, 2018.

VOGLER, CJ, SAACKKE, RG, BAME, JH, DEJARNETT, JM, MCGILLIARD, ML. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3827-3835, 1991.

ZHANG, Y.; XIAO, R.R.; YIN, T.; ZOU, W.; TANG, Y.; DING, J.; YANG, J. Generation of Gradients on a Microfluidic Device: Toward a High-Throughput Investigation of Spermatozoa Chemotaxis. **Plos one**, v.10, n.11, 2015.

Anexo I – Analysis set-up for Hamilton- Thorne Research used to evaluate bull spermatozoa

Variables	Settings
Frames Acquired	30
Frame Rate	60 Hz
Minimum Contrast	80
Minimum Cell Size	5 Pixels
Minimum Static Contrast	15
Straightness (STR), Threshold	70,0 %
Vap Cutoff:	29,9 @m/s
Prog. Min VAP	50,0 @m/s
VSL Cutoff	15,0 @m/s
Cell Size	7 Pixels
Cell Intensity	70
Static Head Size	0,65 to 4,90
Static Head Intensity	0,50 to 2,50
Static Elongation	0 to 71
Slow Cells Motile	YES
Magnification	1,89
Video Frequency	60
Bright Field	NO
LED Illumination Intensity	2220
IDENT Illumination Intensity	3000
Temperature, Set	37,0 °C
Chamber depth	20,0 @m
Chamber position	3,9 mm
Chamber position B	11,8 mm
Chamber position C	18,7 mm
Chamber position D	26,6 mm
Chamber type	Leja4
Field Selection Mode	SELECT
IDENT Fluorescent Option	OFF
Integrating Time	1 Frames
Remote image recall	NO