

## Validação da Sonda BODIPY-Cholesterol para avaliação do efluxo de colesterol pós-capacitação espermática de bovinos em microscopia de fluorescência

Gabriel de Miranda Teodoro Soares<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>, Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup>, Ellen Lara Miguel<sup>1</sup>, Caroline de Rosso<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>2</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP-Brasil  
\*correspondência: celeghin@usp.br

Os espermatozoides devem passar por uma série de eventos bioquímicos, durante o transporte através do trato reprodutivo da fêmea, a fim de serem capazes de fertilizar o oócito. Estes eventos culminam com modificações espermáticas que caracterizam a capacitação espermática; em vista da importância deste evento para a fertilização do oócito, surge, portanto, a necessidade de novas formas de avaliação espermática que possam detectar estes eventos e relacioná-los com o potencial de fertilidade do sêmen. Uma das etapas da capacitação é a depleção do colesterol da membrana plasmática e a redistribuição do colesterol remanescente da região equatorial para apical, permitindo a formação de complexos lipoproteicos de ligação à zona pelúcida (“balsas lipídicas”). Assim, este estudo objetivou propor um protocolo para sêmen bovino com o uso da sonda fluorescente BODIPY-Cholesterol para avaliar o efluxo do colesterol em sêmen bovino pré- e pós-indução da capacitação espermática. Foram utilizados ejaculados de dez touros (n=10). Cada ejaculado foi submetido a análises convencionais (motilidade, vigor, concentração e morfologia). Após, cada amostra foi avaliada em dois momentos: controle (CON) e o induzido à capacitação espermática (CAP), quanto à integridade das membranas plasmática, integridade de membrana acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e efluxo do colesterol de membrana, utilizando-se respectivamente as sondas: Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI), iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e BODIPY-Cholesterol (Top Fluor® Cholesterol - 810255P). Foram contadas 200 células espermáticas, classificando-as em membrana plasmática íntegra (núcleo marcado em azul pelo H342) ou lesada (núcleo marcado em vermelho pelo PI) utilizando o filtro triplo D-F-R (C58420, apresentando os conjuntos UV-2E/C - DAPI - excitação 340nm e emissão 435-485nm, B-2E/C - FITC - excitação 465-495nm e emissão 515-555nm e G-2E/C - Rhodamine - excitação 540-525nm e emissão 605-655nm), e, ao alternar o filtro simples B-2E/C (excitação 465-495 nm), fez-se a contagem dos espermatozoides fortemente e levemente marcados em verde pelo BODIPY-Cholesterol, no mesmo campo. A capacitação foi induzida em meio capacitante FIV-gotas (contendo TL-stock, gentamicina, piruvato, PHE, heparina e BSA) adicionado de 10mM de ionóforo de cálcio (A23187 - Sigma-Aldrich, C7522) por uma hora. Para a análise estatística foi utilizado o programa SAS versão 9.2 (SAS, 2010). Os dados obtidos foram comparados de acordo com o tratamento: Controle (CON) e Capacitado (CAP) por análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey. Foram considerados níveis de significância mínima de 5%. Foi notada que a indução da capacitação espermática (CAP) foi eficiente em aumentar (P=0,0029) a população de espermatozoides com membranas plasmática íntegra e acrossomo lesado ou reagido (CON=8,87 ± 6,1% x CAP= 34,78 ± 4,23%), característico de espermatozoides capacitados. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos CON (verde forte= 19,25 ± 4,19% x verde fraco= 22,05 ± 4,78%) e CAP (verde forte= 14,01 ± 2,85% x verde fraco= 29,0 ± 6,31%) para as células marcadas pelo BODIPY-Cholesterol, seja para a população fortemente marcada (P=0,3249), quanto para aquela fracamente marcada (P=0,6042). Também não foram encontradas diferenças para o total de células marcadas em verde pelo BODIPY-Cholesterol (P=0,7238). Portanto, o protocolo de indução da capacitação espermática *in vitro* demonstrou ser eficaz em promover um estado semelhante ao processo *in vivo*. Por sua vez, o BODIPY-Cholesterol, não se mostrou eficiente - visualmente por microscopia de fluorescência - como um marcador de capacitação espermática e de padrão de distribuição de colesterol por meio da fluorescência.

**Palavras-chaves:** capacitação, colesterol, Bodipy-Cholesterol, fluorescência, microscopia.

**Agradecimentos:** FAPESP (processos nº 2022/12878-0 e 2023/01059-0) e CNPq (processo 312510/2021-7).

## Validation of the BODIPY-Cholesterol Probe for evaluating cholesterol efflux post-sperm capacitation in bovines using fluorescence microscopy

Gabriel de Miranda Teodoro Soares<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>, Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup>, Ellen Lara Miguel<sup>1</sup>, Caroline de Rosso<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>2</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology - Center for Animal Reproduction Biotechnology - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>2</sup>Semen Biotechnology and Andrology Laboratory - Center for Animal Reproduction Biotechnology - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP-Brazil

\*corresponding author: celeghin@usp.br

Sperm must go through a series of biochemical events during transport through the female's reproductive tract in order to be able to fertilize the oocyte. These events culminate in sperm modifications that characterize sperm capacitation; In view of the importance of this event for oocyte fertilization, there is therefore a need for new forms of sperm evaluation that can detect these events and relate them to the fertility potential of the semen. One of the stages of capacitation is the depletion of cholesterol from the plasma membrane and the redistribution of the remaining cholesterol from the equatorial to the apical region, allowing the formation of lipoprotein complexes binding to the zona pellucida (lipid rafts). Thus, this study aimed to propose a protocol for bovine semen using the fluorescent probe BODIPY-Cholesterol to evaluate the efflux of cholesterol in fresh bovine semen before and after induction of sperm capacitation. Ejaculates from ten bulls (n=10) were used. Each ejaculate was subjected to conventional analyzes (motility, vigor, concentration and morphology). Afterwards, each sample was evaluated at two moments: control (CON) and sperm capacitation-induced (CAP), regarding the integrity of plasma membranes, acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and membrane cholesterol efflux, using respectively the probes: Hoechst 33342 (H342), propidium iodide (PI), 5,5',6,6' tetrachloro 1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1), fluorescein isothiocyanate conjugated *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA) and BODIPY-Cholesterol (Top Fluor® Cholesterol - 810255P). Were counted 200 sperm cells, classifying them as intact plasma membrane (nucleus marked in blue by H342) or damaged (nucleus marked in red by PI) using the D-F-R triple filter (C58420, presenting the sets UV-2E/C - DAPI - excitation 340nm and emission 435-485nm, B-2E/C - FITC - excitation 465-495nm and emission 515-555nm and G-2E/C - Rhodamine - excitation 540-525nm and emission 605-655nm), and, when alternating the simple filter B-2E/C (excitation 465-495 nm), spermatozoa strongly and lightly marked in green by BODIPY-Cholesterol were counted in the same field. Capacitation was induced in FIV-drops capacitating medium (containing TL-stock, gentamicin, pyruvate, PHE, heparin and BSA) added with 10mM calcium ionophore (A23187 - Sigma-Aldrich, C7522) for one hour. For statistical analysis, the SAS version 9.2 software (SAS, 2010) was used. The data obtained were compared according to the treatment: Control (CON) and Capacitated (CAP) by analysis of variance and the means compared with the Tukey test. Minimum significance levels of 5% were considered. It was noted that the induction of sperm capacitation (CAP) was efficient in increasing (P=0.0029) the population of sperm with intact plasma membranes and damaged or reacted acrosome (CON=8.87 ± 6.1% x CAP= 34.78 ± 4.23%), characteristic of capacitated spermatozoa. No statistical difference was found between the CON (strong green= 19.25 ± 4.19% x weak green= 22.05 ± 4.78%) and CAP (strong green= 14.01 ± 2.85% x green weak= 29.0 ± 6.31%) for cells marked by BODIPY-Cholesterol, whether for the strongly marked population (P=0.3249) or for the weakly marked one (P=0.6042). No differences were found for the total number of cells marked in green by BODIPY-Cholesterol (P=0.7238). Therefore, the in vitro sperm capacitation induction protocol proved to be effective in promoting a state similar to the in vivo process. In turn, BODIPY-Cholesterol did not prove to be efficient - visually by fluorescence microscopy - as a marker of sperm capacitation and cholesterol distribution pattern through fluorescence.

**Keywords:** capacitation, cholesterol, Bodipy-Cholesterol, fluorescence, microscopy.

**Acknowledgments:** FAPESP (process 2022/12878-0 and 2023/01059-0) and CNPq (process 312510/2021-7).