



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE PERCOLL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

GRAZIELI MARINHEIRO MACHADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
JANEIRO DE 2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE PERCOLL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

ALUNO (A): Grazieli Marinheiro Machado

ORIENTADOR (A): Margot Alves Nunes Dode

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 06/2009

BRASÍLIA/DF
JANEIRO DE 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MACHADO, G.M. **Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção *in vitro* de embriões bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 67p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

MACHADO, Grazieli.Marinheiro. **Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção *in vitro* de embriões bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Força e tempo de centrifugação. 2. Seleção espermática. 3. Desenvolvimento embrionário. 4.Sexo dos embriões. I. Dode, M.A.N. II. Phd

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE PERCOLL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

GRAZIELI MARINHEIRO MACHADO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA/RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA)
(ORIENTADOR) CPF: 395.928.980-49. e-mail: margot@cenargen.embrapa.br**

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 490.390.241-20. e-mail: cmlucci@unb.br**

**JOSÉ ROBSON BEZERRA SERENO, PhD (EMBRAPA/CERRADOS)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 224.518.114-04. e-mail: sereno@cpac.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 27 de JANEIRO de 2009

Dedico este trabalho aos meus Pais, Reginaldo Alves Machado e Maria Aparecida Marinheiro Machado, aos meus irmãos Rodrigo Marinheiro Machado e Luciana Marinheiro Machado; e ao meu companheiro Augusto Moscardini que sempre acreditaram e me apoiaram em mais uma etapa conquistada.

AGRADECIMENTOS

Aos **meus pais e irmãos** que sempre me apóiam e compreenderam em muitos momentos de ausência durante o curso de pós-graduação.

Ao meu companheiro, **Augusto Moscardini**, pelo incentivo. Obrigado por me ensinar que nunca devemos desistir dos sonhos.

Aos **meus amigos e amigas** pela compreensão em muitos momentos ausentes.

À minha orientadora, **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, uma grande pesquisadora, pela amizade, disposição de ajudar, pelos grandes ensinamentos e o sempre apoio durante a realização do projeto.

Aos pesquisadores, **Dr. Eduardo Melo, Dr. Maurício Machaim Franco, Dr. Roberto Sartori Filho e Dr. Rodolfo Rumpf** pela contribuição no aperfeiçoamento dos ensinamentos.

Às amigas de outra geração do Cenargen **Lílian Iguma, Daniela Pereira, Geórgia Corrêa e Daniela Brandão** pela amizade e ensinamentos.

Aos graduandos e pós-graduandos pela disposição a ajudar: **Ligiane, Katlen, Monique, Michele, Maria Clara, Flávia, Juliana, Valquíria, Tatiana Mundim, Jeferson, Marcelo, Tiago....**, muito obrigada.

Aos pós-graduandos, **Emivaldo Siqueira Filho, Ester Caixeta e José Carvalho Filho** pela ajuda efetiva durante o experimento.

Aos **funcionários e estagiários** da Fazenda Sucupira e do Laboratório de Reprodução Animal do Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa, sem os quais não seria possível o dia a dia.

Ao apoio financeiro da **Embrapa/Cenargen e CAPES**.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1. ESTRUTURAS DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS	04
3.2. AVALIAÇÃO DA CÉLULA ESPERMÁTICA	06
3.3. PREPARAÇÃO DO SÊMEN PARA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	14
3.4. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	16
3.5. SEXO DE EMBRIÕES BOVINO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	37
1. RESUMO	38
2. ABSTRACT	39
3. INTRODUÇÃO	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. REGENTES	42
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS	43
4.3.1. AVALIAÇÃO DE MOTILIDADE, MORFOLOGIA E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	43
4.3.2. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, DO ACROSSOMA E DA CROMATINA	44
4.4. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	46
4.4.1. RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
4.4.2. PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO ESPERMÁTICA	46
4.4.3. FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CULTIVO DE EMBRIÕES	47
4.5. PROCEDIMENTO PARA SEXAGEM DOS EMBRIÕES	47
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. RESULTADOS	50
5.2. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	62
7. AGRADECIMENTOS	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE PERCOLL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Grazieli Marinheiro Machado¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil,. ²Médica Veterinária, PhD Brasília-DF, Brasil.

Técnicas de preparação de sêmen são usualmente utilizadas na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos visando melhorar a qualidade espermática após o descongelamento. Dentre estas técnicas, a centrifugação em gradiente de Percoll tem sido a mais utilizada. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes velocidades, tempo de centrifugação e volume de Percoll nas características espermáticas, na produção e sexo de embriões bovinos. Foram descongeladas amostras de sêmen de quatro touros, que foram submetidas a três diferentes procedimentos no gradiente de Percoll : T1 – 4 mL (volume final) de Percoll 45%:90%, centrifugados por 20 minutos a 700 g; T2 – 800 µL (volume final) de Percoll 45%:90% centrifugados por 20 minutos a 700 g e T3 – 800 µL (volume final) de Percoll 45%:90% centrifugados por por 5 minutos a 5000 g. A avaliação espermática da motilidade, morfologia, integridade de acrossoma, membrana e cromatina, foi realizada antes e após a passagem pelo

Percoll. Para a PIV foram utilizados 1194 ovócitos maturados *in vitro*, sendo a taxa de clivagem avaliada em D2 (48h) e a taxa de blastocisto avaliada no dia 7 após fecundação (D7). Os blastocistos em D7 (n=360) foram congelados para determinação do sexo. Os dados do desenvolvimento embrionário e avaliação espermática foram analisados pela ANOVA considerando o efeito de touro, tratamento e interação touro x tratamento ($P < 0,05$). Para analisar o sexo dos embriões utilizou-se o teste χ^2 com frequência esperada de 50:50 ($P < 0,05$). A comparação entre os tratamentos e touro também verificada pelo teste χ^2 . Todos os tratamentos com o Percoll melhoraram significativamente a proporção de espermatozóides móveis. Não houve efeito do tratamento em nenhuma característica espermática avaliada ($P > 0,05$), entretanto, observou-se efeito de touro. A taxa de clivagem e blastocisto também não foi afetada pelos tratamentos com o *Percoll*. Entretanto, foi observado diferenças entre touros ($P < 0,05$). A taxa de clivagem e blastocisto foi melhor para o touro 1 ($86 \pm 1,6^a\%$ e $47 \pm 2,6^c\%$) seguido do touro 2 ($86 \pm 2,1^a\%$ e $39 \pm 6,6^c\%$) e touro 3 ($65 \pm 5,9^b\%$ e $17 \pm 4,1^d\%$). O touro 4 apresentou baixa produção total de blastocisto (n=5), sendo eliminado da análise. A proporção macho:fêmea foi semelhante em todos os tratamentos para os touros 2 e 3. Apenas o touro 1 no T1 apresentou uma maior porcentagem de embriões machos (61%) em relação aos embriões do sexo feminino (39%). Quando apenas os tratamentos foram considerados, independentes dos touros, não foi verificada diferença na proporção macho:fêmea entre T1 (55:45 %), T2 (45:55 %) e T3 (44:56 %). Os resultados mostraram que a utilização de diferentes velocidades, tempo de centrifugação e volume de Percoll não influenciou a taxa de blastocisto e a relação macho:fêmea. Entretanto, para o touro 1 foi observado um desvio para produção de embriões machos quando se utilizou o T1. Esses resultados sugerem a possibilidade de utilizar um menor volume de Percoll por um período de tempo mais curto, diminuindo assim o custo e o tempo para a realização da fecundação *in vitro*.

Palavras chaves: força e tempo de centrifugação, seleção espermática, desenvolvimento embrionário e proporção de sexo.

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT PERCOLL PROCEDURES ON SPERM QUALITY AND *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Techniques for sperm selection are usually used for bovine *in vitro* embryo production (IVP) to improve semen quality after thawing. Among these techniques Percoll gradient has been the most used. The aim of this study was to evaluate the effect of different volumes of Percoll, time and force of centrifugation on sperm quality, embryo development and sex of IVP bovine embryos. Frozen-thawed semen from four bulls were submitted to three different Percoll procedures: T1 - 4 mL (final volume) of Percoll 45%:90%, centrifuged for 20 minutes at 700 g, T2 - 800 μ L (final volume) of Percoll 45%:90% centrifuged for 20 minutes at 700 g and T3 - 800 μ L (final volume) of Percoll 45%:90% centrifuged for 5 minutes at 5000 g. Semen was evaluated before and after Percoll treatment for sperm total motility, morphology, integrity of acrosome, membrane and chromatin. A total of 1194 oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro*, cleavage rate was valued on D2 and blastocyst rate on D7 after *in vitro* insemination. The blastocysts in D7 (n=360) were frozen for posterior sex determination. Data from embryo development and sperm characteristic were analyzed by ANOVA considering the effect of bull, treatment and interaction bull x treatment (P <0.05). The ratios were compared with the expected ratio 1:1 by χ^2 test (P<0.05). All Percoll methods significantly improved the proportion of motile spermatozoa. No effect of treatment was detected in any of the sperm characteristic (P>0.05), however bull-related differences were

observed in all parameters tested. Similarly, cleavage and blastocyst rate were not affected by Percoll procedure ($P>0.05$). However, there was a difference among bulls ($P<0.05$). Sire 4 had very low embryos production ($n=5$), and was eliminated from the analysis. Higher rates of cleavage and blastocyst were observed for bull 1 (86 ± 1.6^a % and 47 ± 2.6^c %) and bull 2 (86 ± 2.1^a % and 39 ± 6.6^c %) showed than for bull 3 (65 ± 5.9^b % and 17 ± 4.1^d %). The proportion of male:female embryos was similar in all treatments for bulls 2 and 3. Only bull 1 in the T1 presented a greater percentage of male (61%) than female embryos (39%). When only treatments were considered, independent of bulls, no difference was found in proportion male:female (%) among T1 (55:45), T2 (45:55) and T3 (44:56). The results showed that the use of different speed, time of centrifuge and volume of Percoll gradient did not influence the rate of blastocyst and the male:female ratio. However, for bull 1 it was observed a higher production of male embryos when T1 was used. These results suggest the possibility of using a lower volume of Percoll for a shorter period of time, thus reducing the cost and time to perform the *in vitro* fertilization.

Keywords: force and time of centrifugation, sperm selections, embryo development, sex ratio.

LISTA DE FIGURAS**Capítulo 2**

Figura	Página
Figura 1 – Identificação do sexo através da amplificação do DNA em gel de agarose. P) marcador de peso molecular; ♀) embrião fêmea, ♂) embrião macho.	49
Figura 2 – Distribuição de embriões PIV bovinos machos e fêmeas em D7 nos três tratamentos com o Percoll.	56

LISTA DE TABELAS**Capítulo 2**

Tabela	Página
Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na sexagem de embriões (S: <i>sense</i> ; A: <i>antisense</i>) e tamanho, pares de base (pb), dos fragmentos amplificados.	48
Tabela 2 – Motilidade total e porcentagem de células espermáticas com morfologia normal, membrana, acrossoma, e cromatina intactos antes e após a passagem pelo gradiente de Percoll.	51
Tabela 3 – Motilidade total e porcentagem de células espermáticas com morfologia normal, membrana, acrossomo e cromatina intactos para os quatro touros após o tratamento com o Percoll.	52
Tabela 4 – Dados descritivos da taxa de clivagem e blastocisto após a fecundação <i>in vitro</i> utilizando espermatozóides de quatro touros submetidos a três protocolos diferentes de Percoll.	53
Tabela 5 – Taxa de clivagem e blastocisto após a fecundação <i>in vitro</i> utilizando sêmen de três touros diferentes.	54
Tabela 6 – Proporção dos sexos em blastocisto de D7 utilizando espermatozóides de três diferentes touros (1, 2 e 3) em três diferentes tratamentos (T1, T2 e T3) após a FIV.	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AT	Azul de toluidina
CASA	<i>Computer-Assisted Semen Analyses</i>
COC	Complexos <i>cummulus</i> ovócito
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF 9	<i>growth differentiation factor-9</i>
HOST	<i>Hypoosmotic swelling test</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IP	Iodeto de propídio
LA	Laranja acridina
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	<i>Mitogen protein kinase k</i>
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator promotor de fase M
MZT	Transição materno zigótica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	Prófase I
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>
PSA	<i>Pisum sativum</i>
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
SFB	Soro fetal bovino
SOF	<i>synthetic oviductal fluid</i>
TBG	<i>Tryplan blue e giemsa</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling</i>
VG	Vesícula germinativa

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões de mamíferos domésticos é uma biotécnica bastante utilizada como alternativa para acelerar a multiplicação de animais geneticamente superiores. Essa técnica vem sendo incorporada nos programas de melhoramento animal de rebanhos bovinos comerciais brasileiros, que é o segundo maior do mundo, ultrapassando 200 milhões de cabeça (IBGE, 2006). De fato, o Brasil ocupa hoje uma posição de destaque no cenário internacional com relação a essa biotécnica, sendo responsável por 48,5% da produção mundial de embriões (Viana & Camargo, 2007).

Apesar de inúmeros estudos realizados nos últimos 30 anos com o objetivo de melhorar a eficiência de PIV, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (Lonergan & Fair, 2008). Além disso, existem outras limitações técnicas que restringem sua expansão tais como, custo elevado, embriões com qualidade inferior aos produzidos *in vivo* (Lonergan & Fair, 2008), alta sensibilidade à criopreservação, redução de sobrevivência fetal e nascimento de bezerros com anormalidades (Farin et al., 2006; Hansen, 2006,).

O processo da PIV consiste de várias etapas interdependentes que se não forem realizadas de forma adequada podem comprometer o seu sucesso. Dentre os diversos fatores que afetam o sistema PIV de embriões bovino encontra-se basicamente a qualidade dos ovócitos (Lonergan & Fair, 2008) os espermatozóides utilizados para fecundação *in vitro* (FIV) (Hansen, 2006) e as condições de cultivo (Lonergan & Fair, 2008).

A influência dos métodos de preparação espermática na PIV tem sido extensivamente estudada. A seleção de espermatozóides realizada antes da inseminação *in vitro* visa obter células espermáticas viáveis, com maior motilidade, remover o plasma seminal, crioprotetor e agentes infecciosos, além de debris celulares (Henkel & Schill, 2003). Para selecionar espermatozóides viáveis várias técnicas estão disponíveis tais como o *swim up*, gradiente de *Percoll* e a lavagem por centrifugação. Dentre essas técnicas, o gradiente de *Percoll* é uma das mais usadas em bovinos. A metodologia usual do *Percoll* consiste na formação de um gradiente contínuo gradual, onde a densidade aumenta no sentido da camada superior para a inferior. A amostra de sêmen é depositada sobre as camadas e centrifugada para obtenção de pellet contendo espermatozóides selecionados.

Entretanto, esse protocolo vem sendo modificado devido ao aumento da utilização de sêmen sexado (Dell'Aqua et al., 2006). Essas modificações são necessárias, pois o sêmen sexado apresenta características próprias tais como baixa motilidade pós-descongelamento (Palma et al., 2008) e baixa taxa de blastocisto quando se comparado ao sêmen não sexado (Wilson et al., 2006). As alterações propostas no procedimento do *Percoll* se referem basicamente à diminuição do volume, aumento da rotação e redução do tempo de centrifugação (Dell'Aqua et al., 2006). Se essas alterações no protocolo pudessem também ser utilizadas para todas as amostras de sêmen, independente de serem sexadas ou não, seria de grande interesse não só pela redução de custo, mas também por reduzir o tempo de realização da FIV. Entretanto, não se sabe se essas mudanças no procedimento alterariam a produção, e, principalmente, se modificariam a relação macho:fêmea dos embriões. Portanto, para que se possa alterar o procedimento da preparação espermática é necessário avaliar não só o efeito dessa alteração na qualidade espermática, mas também na produção e sexo dos embriões.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tempo, velocidade de centrifugação e volume de *Percoll* no sistema de PIV de embriões bovinos quanto às características espermáticas, desenvolvimento embrionário e sexo dos embriões.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Estrutura das células espermáticas

Espermatozoides são produzidos nos testículos por um processo chamado de espermatogênese. A estrutura do espermatozoide compreende dois componentes, a cabeça e a cauda. A cabeça do espermatozoide é formada basicamente pelo núcleo celular, que ocupa 65%, e pode ser dividida em duas regiões: acrossomal e pós-acrossomal. O acrossoma é uma fina cobertura com dupla camada de membrana que envolve intimamente a parte anterior do núcleo formada pelo complexo de Golgi durante a fase de espermiogênese. A capa do acrossoma, o capuchão, contém glicoproteínas e enzimas como a hialuronidase e proacrosina responsáveis pela penetração do espermatozoide no ovócito (Barth & Oko, 1989). O segmento equatorial do acrossoma, região entre o capuchão e o segmento pós-acrossomal, é importante porque é a parte do espermatozoide que, juntamente com a porção anterior da região pós-acrossomal se funde com a membrana do ovócito durante a fecundação (Garner & Hafez, 2004). O formato da cabeça varia entre as espécies, possuindo forma de gancho em ratos e camundongos ou forma achatada e arredondada em humanos e animais domésticos (Barth & Oko, 1989). O núcleo contém cromatina altamente condensada composta de ácido desoxirribonucléico (DNA), que forma um complexo com uma classe especial de proteínas conhecidas como protaminas espermáticas. O conteúdo de DNA é haplóide, ou seja, metade das células somáticas da mesma espécie (Garner & Hafez, 2004). A cromatina é sustentada inicialmente por histonas que são substituídas pelas protaminas e mantidas unidas através de ligações dissulfídricas à medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo, conferindo a estabilidade e a condensação do DNA (Setchell, 1993; Garner & Hafez, 2004). A região pós-acrossomal é sustentada pelo plasmalema. Neste local encontra-se a parte posterior do núcleo e os microtúbulos, formorando a fossa de implantação em que a cauda é inserida (Barth & Oko, 1989; Setchell, 1993).

A cauda do espermatozóide de mamíferos varia em relação ao tamanho e forma, mas a estrutura geral é similar. A cauda é dividida em quatro partes anatômicas bem distintas: colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. No centro da cauda encontra-se o axonema central, composto por centríolos arranjados sob forma de nove pares de microtúbulos disposto radialmente ao redor de dois filamentos centrais (conformação 9+2) (Barth & Oko, 1989; Garner & Hafez, 2004;). Os microtúbulos consistem de duas subunidades: as subfibras A e B. A subfibra A possui duas fileiras de braço que se projetam em direção à dupla de microtúbulos vizinhos. Estes braços, que tem alta atividade ATPase são provavelmente a base para a motilidade espermática (Setchell, 1993).

O colo fica próximo à peça intermediária sendo a porção da cauda que se liga a cabeça do espermatozóide. Na sua extremidade proximal, a região articular chamada de *capitulun* é fixada pela membrana basal do núcleo por uma série de delicados filamentos (Setchell, 1993).

Na peça intermediária, os arranjos 9+2 de microtúbulos estão circundados por nove fibras densas. O axonema e as fibras densas associadas à peça intermediária são recobertos periféricamente por uma camada de mitocôndrias dispostas em forma helicoidal que são responsáveis pelo fornecimento de energia e conseqüentemente pela motilidade dos espermatozóides (Barth & Oko, 1989; Garner & Hafez, 2004).

A peça principal, que continua posteriormente ao *annulus* e se estende até a parte terminal da cauda, é composta centralmente do axonema associado às fibras espessas. A formação de uma camada fibrosa fornece estabilidade dos elementos contráteis da cauda (Garner & Hafez, 2004).

A peça terminal, porção final da camada fibrosa contém o axonema responsável pela motilidade espermática. Os pares externos de microtúbulos de padrão 9+2 geram as ondas curvas da cauda por meio de um movimento de deslizamento (Garner & Hafez, 2004). Entretanto, à medida que vão se tornando mais distais, os túbulos duplos vão se dissociando e desaparecendo, sendo que o último a desaparecer é o túbulo central (Barth & Oko, 1989).

A membrana plasmática é a estrutura que abrange todos esses domínios específicos da célula espermática: o acrossoma, segmento equatorial, segmento basal região intermediária e cauda. Ela tem a função de envolver e de internalizar organelas e componentes intracelulares, além de permitir trocas de íons e outros componentes solúveis. Portanto, torna-se necessário manter a membrana espermática íntegra para que os espermatozóides consigam fecundar os ovócitos (Silva & Gadelha, 2006).

3.2. Avaliação da célula espermática

Os parâmetros utilizados rotineiramente para avaliar a qualidade de sêmen são a avaliação subjetiva da motilidade e avaliação visual da proporção de espermatozóides com morfologia normal. Esses métodos embora úteis e importantes são de valor limitado para prever a fertilidade no que se refere à capacidade fecundante do sêmen. Isso porque, para que a fecundação ocorra os espermatozóides além de móveis e normais precisam ser capazes de sofrer a reação do acrossoma e penetrar o ovócito. Além disso, para que a fecundação ocorra com sucesso, o espermatozóide que foi incorporado ao citoplasma do ovócito precisa descondensar a cromatina da cabeça e formar o pró-núcleo masculino, para que se possa unir ao pró-núcleo feminino, formar um novo indivíduo e proporcionar desenvolvimento embrionário normal (Yanagimachi et al., 1994). E, ainda existem evidências de que a baixa qualidade seminal pode resultar na redução de embriões de boa qualidade e falha no reconhecimento materno da prenhez (Walters et al., 2004). Portanto, os testes convencionais de qualidade do sêmen são ainda considerados insuficientes para avaliar as alterações funcionais e estruturais, que tornam a célula espermática apta para fecundar o ovócito. Por esse motivo, para uma avaliação mais acurada da funcionalidade da célula espermática, além

dos testes que avaliam a motilidade e a morfologia, métodos que considerem outros atributos dos espermatozóides, devem ser realizados.

Esses novos testes utilizados para verificação da estrutura das células espermáticas incluem a avaliação da integridade de acrossoma, integridade de membrana plasmática, teste de ligação à zona pelúcida (Rodriguez-Martinez et al., 1997), e teste de integridade de cromatina (Silva et al., 2003).

A motilidade é uma característica essencial para a fertilidade (Pilip et al., 1995), possibilitando o transporte no trato reprodutivo feminino e a penetração do espermatozóide nas células do *cumulus oophorus* e na zona pelúcida. Porém, este teste não pode ser considerado como o único indicativo da capacidade fecundante, pois os espermatozóides perdem sua capacidade de fecundar antes de perderem sua motilidade. A motilidade espermática é uma avaliação subjetiva, podendo estar sujeita a variação na dependência do treinamento do técnico (Hafez, 1995; Arruda et al., 2007). A avaliação da motilidade de forma subjetiva é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozóides móveis presentes na amostra. A determinação dessa característica pode ser realizada colocando uma amostra de sêmen diluído ou fresco sob uma lâmina coberta com lamínula previamente aquecida à 37° C, e a análise é realizada no microscópio óptico utilizando em aumento de 200X a 400X. Junto ao exame de motilidade, avalia-se o grau de vigor que pode ser classificado entre 0 e 5. Essa estimativa se refere à qualidade do movimento das células, ou seja, a velocidade com que atravessam o campo microscópico, onde a pontuação 0 significa imobilidade total e 5 velocidade máxima (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998; Pimentel, 2002; Ax et al., 2004).

Várias técnicas já foram desenvolvidas para uma avaliação objetiva da motilidade espermática como a fotomicrografia, a videomicrografia e o sistema de análise de *Computer-Assisted Semen Analyses* (CASA) que estão sendo utilizados em laboratórios de referências para determinar o movimento espermático (Ax et al., 2004). Entretanto, estudos têm mostrado que a simples avaliação subjetiva, se realizada de forma correta por um técnico treinado, não difere das avaliações objetivas. Januskauskas et al. (2001) compararam a

avaliação subjetiva e avaliação pelo CASA e observaram resultados semelhantes entre os dois métodos ($62,8 \pm 6,5$ e $72,4 \pm 9,9\%$, respectivamente). No entanto, no CASA um número maior de variáveis, são analisadas tais como a qualidade do movimento dos espermatozóides, sua trajetória, velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude (Arruda et al., 2007). O conjunto dessas variáveis reflete melhor a condição fisiológica da célula, e conseqüentemente, permite uma melhor avaliação (Cardoso et al., 2005)

Estudos têm mostrado que a motilidade é uma variável importante para prever a fertilidade. Correa et al. (1997) verificaram que há correlação ($r=0,53$; $p<0,01$) entre a motilidade pós-descongelamento e fertilidade com diferença significativa entre os touros de alta ($r=0,61$, $p<0,01$) e baixa fertilidade ($r=0,39$; $p<0,01$). Januskauskas et al. (2001) também observaram uma correlação entre a motilidade espermática e fertilidade tanto para avaliação subjetiva ($r=0,66$; $p<0,001$) como para a avaliação computadorizada ($r=0,53$, $p<0,05$) Além disso, a avaliação subjetiva da motilidade de espermatozóides pós-descongelamento apresentou correlação positiva ($r=0,53$, $p<0,05$) com a fertilidade a campo pela observação da taxa de não retorno ao cio após 56 dias da inseminação (Januskauskas et al., 2000).

As anormalidades morfológicas dos espermatozóides apresentam uma correlação alta com a fertilidade de touros. Thundathil et al. (2002) mostraram que espermatozóide com defeito de acrossoma (knobbed), muito comum em sêmen de touros com distúrbio na espermatogênese (Barth & Oko, 1989), apresentava capacitação prematura impossibilitando a ligação na zona pelúcida e reduzindo a taxa de FIV. Há relatos de que espermatozóides com cabeça piriforme e acrossoma intacto, mas com motilidade normal têm a capacidade de penetrar a zona pelúcida, porém a possibilidade de atingirem o ooplasma é inferior em relação a espermatozóides que não apresentam esse defeito (Thudathil et al., 1999). Walters et al. (2004) mostraram que a taxa de clivagem após a FIV baixou de 85 % para 66% quando foi utilizado sêmen com 50% de espermatozóides com cabeça piriforme e vacúolos apicais após três semanas de insulação testicular. Pilip et al. (1995) verificaram que espermatozóides vacuolizados têm possibilidade de se ligar a zona pelúcida, mas a taxa de penetração no ovócito é baixa (52,7%) e quando ocorre, verifica-se uma baixa taxa na formação do pró-núcleo masculino (32,3%), impedindo o desenvolvimento embrionário. As

patologias espermáticas possuem inúmeras causas tais como origem genética, temperatura do ambiente, umidade, idade do animal, variações de manejo e disponibilidade de forragens (Pacheco et al., 2007). A fertilidade do touro, em geral, diminui quando as células espermáticas anormais excedem 20% de defeitos totais e 10% defeitos maiores, que incluem cabeça isolada, gota proximal, cauda enrolada, cabeça piriforme, defeitos de acrossoma e defeitos de peça intermediária (Pimentel, 2002; Ax et al., 2004).

A morfologia espermática pode ser avaliada com a utilização de esfregaços corados com fucsina-eosina, vermelho congo ou rosa bengala; ou através da preparação úmida, avaliada no microscópio de contraste de fase (Colégio Brasileiro De Reprodução Animal, 1998). As patologias são classificadas em defeitos maiores, que inclui a maioria de lesões de cabeça e peça intermediária; e em defeitos menores, cabeça delgada, cabeça isolada, inserção de cauda, cauda dobrada e gota citoplasmática distal (Silva et al., 2002). Para Ax et al. (2004) as anormalidades são catalogadas como primárias, secundárias e terciárias. As primárias estão associadas com a cabeça espermática e o acrossoma; as secundárias referem-se à presença de gotas citoplasmáticas proximal; e as terciárias referem-se a outros defeitos da cauda.

A estrutura da membrana plasmática compreende proteínas específicas para o transporte de glicose e frutose que se encontram no ambiente extracelular. O espermatozóide maduro utiliza estes monossacarídeos como substratos para síntese de ATP que é produzido pelo processo anaeróbico da glicólise. Também é um constituinte da membrana plasmática de espermatozoides dos mamíferos, uma camada dupla de lipídeos, composta de, aproximadamente, 70% de fosfolipídeos, 25% de colesterol e 5% de glicolipídios (Flesch & Gadella, 2000). Essa estrutura faz com que esta célula seja sensível ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo promove a capacitação espermática, contudo em excesso causa danos irreparáveis na membrana, fazendo com que o espermatozóide fique afuncional (Flesch & Gadella, 2000; Aurich, 2005). Portanto, para que a fecundação ocorra é necessário manter a membrana espermática íntegra a não ser que os espermatozoides sejam utilizados na injeção intracitoplasmática (ICSI) (Silva & Gadelha, 2006). Testes laboratoriais específicos têm sido desenvolvidos para determinar a integridade da membrana, que se estiver lesada impede que a fecundação ocorra. Antigamente, eram utilizadas colorações baseadas em corantes supra-

vitais com destaque para eosina e nigrosina (E/N). A eosina penetra em espermatozóides não viáveis que tem a membrana rompida, apresentando uma coloração vermelha, a nigrosina deixa um fundo escuro na lâmina para facilitar a visibilidade de espermatozóides viáveis, quando observados no microscópio de campo claro (Tartaglione & Ritta, 2004). Tanghe et al. (2002) observaram um aumento de 20% de células viáveis (eosina-nigrosina) após o *Percoll*, no sêmen bovino congelado e ainda verificaram uma alta correlação ($r=0,81$; $P<0,05$) entre número de células íntegras após a FIV e a taxa de formação de pró-núcleos, confirmando que a integridade da membrana plasmática é essencial para fecundação. Atualmente, utilizam-se substâncias fluorescentes como diacetato de fluoresceína (FDA), iodeto de propídio (IP), ou SYBR-14, estes métodos permitem diferenciar membranas intactas e lesadas dos espermatozóides (Aurich, 2005; Silva & Gadelha, 2006). O FDA é metabolizado por esterases intracelulares em carboxyfluoresceína verde fluorescente que é incapaz de atravessar membranas intactas, se acumulando no interior de células vivas. O marcador SYBR-14 e o IP são marcadores específicos de DNA, o SYBR-14 emite uma coloração verde quando as células estão vivas e o IP uma coloração vermelha para células mortas. O FDA também permite visualizar espermatozóides semi-lesados através da variação do verde fluorescente que é observado acima da peça intermediária, indicando que o FDA foi metabolizado e ficou retido na mitocôndria intacta. O IP é geralmente utilizado junto ao FDA ou SYBR-14. A coloração com eosina e nigrosina caiu em desuso por mostrar um valor super estimado do número de espermatozóides com membrana intacta quando comparado à técnica de fluorescência (Aurich, 2005; Graham & Mocé, 2005). Entretanto, resultados obtidos por Carvalho et al. (2008) mostraram que a média de porcentagem de espermatozóides com membrana intacta foi similar entre a técnica E/N ($53,41 \pm 14,57\%$) e FDA ($45,39 \pm 7,46\%$).

Além das técnicas de coloração do espermatozóide, outro método para verificar a integridade de membrana é submeter à amostra de sêmen a uma solução hipotônica, *hypoosmotic swelling test* (HOST). O princípio do HOST é proporcionar ativação biomecânica da membrana plasmática do espermatozóide. Na solução hiposmótica ocorre o transporte de água através da membrana espermática até que um equilíbrio seja alcançado entre o espermatozóide e o ambiente extracelular. Os espermatozóides com membrana íntegra apresentam a cauda enrolada quando analisado no microscópio de contraste de fase. Já os espermatozóides com danos não têm a capacidade de acumular fluido no citoplasma, conseqüentemente não enrolam a cauda (Nagy et al., 1999; Thundathil et al., 2002). A

proporção de espermatozóides intactos que passam pelo método hiposmótico é proporcionalmente equivalente aos espermatozóides com membrana intacta observados na fluorescência (Aurich, 2005), e mais eficiente do que a técnica dos corantes supra-vitais (Tartaglione & Ritta, 2004).

A avaliação do estado acrossomal dos espermatozóides de mamíferos é muito importante devido a integridade dessa porção ser fundamental para a fecundação (Sánchez et al., 1995). O significado da detecção de reação acrossômica se baseia no fato de que espermatozóides já capacitados antes da inseminação possuem longevidade reduzida e, conseqüentemente, uma grande probabilidade de não fecundar o ovócito (Neild et al., 2005). Isso porque após sofrer a reação do acrossoma os espermatozóides não podem mais se ligar à zona pelúcida e logo não podem mais penetrar o ovócito. Portanto, testes laboratoriais de sêmen para verificar a porcentagem de espermatozóides com acrossoma intacto são importantes para determinar a taxa de fertilidade do sêmen (Silva, 1998; Tartaglione & Ritta, 2004).

A integridade acrossomal tem sido avaliada pela combinação dos corantes supra-vitais, o *trypan-blue* e o *giemsa* (TBG). A penetração do *tryplan blue* ocorre quando há lesão da membrana espermática e o *giemsa* cora o acrossoma. Esta metodologia é fácil e vantajosa para estimar a viabilidade do sêmen (Tartaglione & Ritta, 2004; Fernandes et al., 2008). A técnica possibilita distinguir espermatozóides vivos com acrossoma intactos ou reagidos, e mortos com acrossoma intactos ou reagidos (Silva, 1998). A integridade do acrossoma pode ser também determinada pela técnica de fluorescência conjugada com lecitina, que é uma glicoproteína isolada de sementes de várias plantas. A lecitina conjugada se liga a resíduos carboidratos que fazem parte de glicoproteínas que estão exclusivamente localizadas no acrossoma. Dependendo da espécie de mamíferos utiliza-se um tipo de lecitina que pode ser o *Pisum sativum* (PSA, ervilha verde) ou o *Arachis hypogaea* (PNA, amendoim). Para bovinos, eqüinos, caninos e suínos utiliza-se o PNA (Cross & Watson, 1994; Silva & Gadellha, 2006; Gillan et al., 2008). As lecitinas específicas do acrossoma podem ser conjugadas com grupos fluorescentes. O isotiocianato fluorescinado (FITIC) é uma sonda fluorescente que deve ser ligado à lecitina com intuito de verificar o estado acrossomal de espermatozóides. Essa sonda se liga a membrana acrossomal externa quando esta exhibe

uma alteração de permeabilidade. Para diferenciar os espermatozóides com perda total de acrossoma dos intactos utiliza-se o iodeto de propídio (IP) em conjunto com FITIC, que irá corar o DNA devido a impermeabilidade da membrana (Colenbrander et al., 2003; Cunha & Lopes, 2005). A ausência de fluorescência é um indicativo de acrossoma intacto, e fluorescência indica que ocorreu uma reação acrossomal (Silva & Gadelha, 2006). Portanto, pela técnica de FITIC-PNA com IP sob análise de microscopia de epifluorescência alternada com campo claro, os espermatozóides podem ser classificados nas seguintes categorias: 1) vivos – células não coradas e vista por microscopia de campo claro; 2) mortos – espermatozóides com núcleo vermelho; 3) reação acrossomal verdadeira – células espermáticas emitem fluorescência verde apenas no acrossoma; 4) reação acrossomal falsa – espermatozóides emitem fluorescência verde na região acrossomal e núcleo vermelho (Zúccari et al., 2008). A técnica de TBG e FITIC-PNA/PI têm mostrado variações em seus resultados entre as categorias dos espermatozóides avaliados. Zúccari et al. (2008) observaram correlação positiva ($r=0,69$; $P<0,50$) para categoria de vivos entre as técnicas de FITIC-PNA e TBG, em contrapartida, não detectaram correlação entre essas duas técnicas de coloração para espermatozóides que sofreram reação do acrossoma. Quanto à porcentagem de espermatozóides mortos, esses autores observaram uma correlação significativa de média intensidade entre TBG e FITIC- PNA/PI ($r=0,37$, $p<0,05$). Já Carvalho et al (2008) verificaram maior porcentagem de células espermáticas danificadas pelo método do FITIC-PNA/PI em relação ao TBG.

A integridade do DNA é essencial para perfeita transmissão da informação genética para a próxima geração, e conseqüentemente, para a embriogênese. O DNA paterno está relacionado com controle epigenético, assim como a regulação da transcrição do DNA, tradução e a função cromossômica no desenvolvimento do embrião. Por isso, diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar integridade de cromatina tais como o teste *Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling* (TUNEL), o teste de laranja acridina (LA), método do azul de toluidina (AT) e *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA). A capacidade de essas técnicas avaliarem os danos ao DNA do espermatozóide depende de muitos aspectos técnicos e biológicos (Shuffner & Plácido, 2008).

A avaliação de TUNEL se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com um corante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína-FITC) na região livre 3'OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla. Para a quantificação da incorporação da desoxiuridina trifosfato (dUTP) nas terminações livres 3'OH do DNA ocorre uma reação enzimática catalisada pela enzima desoxinucleotideo terminal transferase (TdT) (Everson & Wixon, 2006) que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA. A incorporação de d-UTP fluoresceína é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e mensurada por microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo. Os espermatozoides examinados microscopicamente são identificados como TUNEL positivo (DNA fragmentado), devido à presença de coloração verde na cabeça espermática determinada pela ação do corante isotiocianato de fluoresceína-FITC, ou negativo (DNA íntegro), de acordo com a presença de coloração azul na cabeça espermática, devido à contra-coloração com o corante *Hoechst* 33342 9 (Martins et al., 2007; Shuffner & Plácido, 2008).

O teste de LA é uma técnica simples que avalia a suscetibilidade de desnaturação “in situ” pela quantificação da fluorescência emitida usando o corante laranja acridina. Esse corante quando se intercalar em DNA dupla fita emite coloração verde (DNA intacto) e em DNA simples fita emite coloração vermelha alaranjada (DNA danificado). Sua avaliação é feita por microscopia de fluorescência (Everson & Wixon, 2006; Shuffner & Plácido, 2008). Segundo Martins et al (2007) o teste do TUNEL é melhor para detectar injúrias no DNA quando comparado à técnica de LA. Essa diferença pode ocorrer devido a subjetividade na leitura e interpretação dos resultados e a rápida perda da fluorescência (Martins et al., 2007). Para diminuir o erro de subjetividade, a quantificação da fluorescência quando se utiliza o LA pode ser medida por citometria de fluxo, que nesse caso é chamada SCSA. Esta análise é realizada por um software que cria um gráfico mostrando a porcentagem de espermatozoides que apresentam o seu DNA danificado estabelecendo o índice de fragmentação do DNA dos espermatozoides (DFI) (Everson & Wixon, 2006; Shuffner & Plácido, 2008). Altas correlações têm sido encontradas em espermatozoides de touro com cromatina desnaturada detectada pelo teste SCSA e a taxa de fertilidade. Em equinos foi observado uma maior taxa de espermatozoides com cromatina desnaturada em sêmen de garanhões subfêrteis do que nos fêrteis (32% vs. 16%, respectivamente) (Colenbrander et al., 2003).

O método de AT é baseado no tratamento ácido (HCl 4N a 25 °C) seguido de coloração de azul de toluidina a pH 4,0, na qual uma variedade de tonalidades são expressas conforme a disponibilidade e proximidade de grupos fosfato do DNA não ligados à proteína, aptos a ligarem moléculas do corante (Naves et al., 2004). As células espermáticas são avaliadas em microscopia de campo claro e classificadas como: cabeças coradas com azul claro, cromatina íntegra; cabeças coradas com azul escuro/violeta – falha na condensação de cromatina (Zúccari et al., 2008). Em avaliação de espermatozóides equinos, foi observado que alterações de cromatina foram melhor detectadas pelo AT em relação à LA, apesar de existir correlação entre os testes ($r=0,55$, $P>0,05$) (Naves et al., 2004). A diferença entre AT e LA pode ser explicada pelo fato dessas colorações detectarem fatores distintos, ou seja, enquanto AT detecta a quantidade de grupos fosfatos livres, LA detecta a proporção de fita simples e duplas do DNA (Naves et al., 2004).

3.3. Preparação do sêmen para fecundação *in vitro*

Diferentes tratamentos com sêmen são realizados previamente à FIV com o objetivo de retirar diluentes utilizados no congelamento, remover agentes infecciosos, selecionar os espermatozóides mais móveis e remover plasma seminal (Dode et al., 2002; Somfai et al., 2002; Samardzija et al., 2006). As técnicas de seleção de espermatozóides mais comumente utilizadas na rotina da FIV tanto em humano como em bovino são: *swim up* e gradiente de densidade de *Percoll* (Somfai et al., 2002).

No *swim up*, os espermatozóides vivos são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores pela motilidade ascendente. Nesse processo mistura-se o sêmen com meio SP-TALP (*Tyrodes*, albumina, lactato e piruvato) em tubos que são colocados, com inclinação para formar um ângulo de 45°, e incubados a 39°C em banho-maria. Desta forma os espermatozóides migram para a porção superior do meio e os demais constituintes do sêmen permaneçam no fundo do tubo (Gonçalves et al., 2001; Somfai et al., 2002). Após a incubação o sobrenadante é centrifugado e o *pellet* utilizado para a inseminação *in vitro* (Dode et al., 2002).

Na separação espermática com o *Percoll*, o sêmen é centrifugado através da passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozóides vivos dos demais constituintes. O *Percoll* é composto de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro) coberto com polivinilpirrolidona (PVP), preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente necessário de separação espermática (Avery & Greve, 1995). Em geral é preparada uma solução de *Percoll* 90% e 45%, sendo o conteúdo de uma palheta de sêmen descongelado e depositado sob este gradiente em seguida centrifugado e o *pellet* utilizado para a inseminação *in vitro* (Gonçalves et al., 2001; Samardzija et al., 2006).

Tanghe et al. (2002) mostraram que a centrifugação com gradiente de *Percoll* foi fundamental para separação de espermatozóides, aumentando a percentagem de células vivas e com alta atividade mitocondrial, de touros utilizados na FIV. Além disso, eles observaram uma melhora, nos espermatozóides de touros com baixa taxa de FIV. Prakash et al. (1998) mostraram que para humanos o *Percoll* proporcionou uma maior concentração de espermatozóides morfolologicamente normais em relação à técnica do *swim up*. Para bovinos, a concentração espermática também foi maior quando se utilizou o gradiente de *Percoll* ($9,3 \times 10^6$ / ml) em relação ao *swim up* ($5,8 \times 10^6$ / ml) (Somfai et al. 2002). O gradiente de *Percoll* foi importante para selecionar espermatozóides com mais movimento, aumentar a percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto e morfolologicamente normais (Moohan et al., 1995; Fernandes et al. 2008). Segundo Parrish et al. (1995) para se obter uma ótima taxa de recuperação de espermatozóides móveis pelo gradiente de *Percoll* em relação ao *swim up* é necessário um tempo de centrifugação de 15 minutos com 700 g de velocidade de centrifugação. Porém, após a FIV, esses autores observaram que o a técnica do *swim up* ($74 \pm 5\%$) resultou em uma melhor penetração de ovócitos em relação ao *Percoll* ($52 \pm 8\%$). Já Dode et al (2002) mostraram que a preparação do sêmen pelo *Percoll*, *swim up* e uma simples lavagem com SP-TALP não afetou a taxa de fecundação. Quanto à PIV de embriões, maior taxa de blastocisto em D7 foi obtida quando sêmen de dois touros foi selecionado pelo gradiente de *Percoll* do que quando selecionado pelo *swim up* (Cesari et al., 2006). Entretanto Parrish et al (1995) observaram que desenvolvimento de mórula e blastocisto não foi diferente entre os métodos de separação espermática pelo *Percoll*, ou pelo *swim up*. Apesar de alguns resultados divergentes, para a maioria dos grupos o *Percoll* é a técnica preferencial para preparação de espermatozóides bovinos na rotina da FIV, por ser um procedimento rápido,

simples e não apresentar variabilidade de resultados quando aplicada por diferentes laboratórios (Moohan et al., 1995; Parrish et al., 1995).

3.4. Produção *in vitro* de embriões bovino

A PIV de embriões se refere à combinação de vários processos interdependentes que vão desde a MIV de ovócitos até a produção de embriões prontos para serem transferidos para as receptoras.

Os ovócitos encontram-se no interior do folículo ovariano que são formados em ovários de fêmeas mamíferas durante a fase fetal. A população destes folículos é muito vasta em todos os mamíferos, e foi estimada, em 130.000 para bovinos de raça européia (Erickson, 1966) e 70.500 para zebuínos (Lucci et al., 2002) .

No bovino, assim como na maioria dos mamíferos domésticos, o processo de formação dos ovócitos inicia na vida fetal. Durante esse período de formação, as células germinativas primordiais diferenciam-se em oogônias, que se multiplicam por mitose, e após um período de síntese de DNA entram em meiose tornando-se ovócitos primários. Estes permanecem em prófase I (PI) na fase de diplóteno até pouco antes da ovulação (van den Hurk & Zhao, 2005). Somente ovócitos competentes têm a capacidade de sofrer a maturação completa, que incluem várias mudanças celulares e moleculares necessárias para garantir uma fecundação monospermica, descondensar a cabeça do espermatozóide, transpor a transição materna zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento embrionário. Portanto, o ovócito tem que sofrer não só a maturação nuclear e citoplasmática, mas também a maturação molecular (Dode, 2006).

O controle da maturação é realizado em parte, por alterações de fosforilação de proteínas, por alteração dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e dos níveis de cálcio. Esse controle inclui também uma proteína chamada de fator promotor de fase M

(MPF), que é responsável pela retomada da meiose, sendo que sua ativação precede ou ocorre concomitantemente com o rompimento da vesícula germinativa (VG). O MPF é um complexo formado por uma subunidade regulatória que é a ciclina B e uma subunidade catalítica que é a quinase p35cdc2. (van den Hurk & Zhao, 2005). A ativação do MPF requer inicialmente a formação do complexo p34cdc2 – ciclina B e, posteriormente a fosforilação e desfosforilação do próprio p34cdc2. Portanto, a retomada da meiose e a maturação são controladas por proteínas quinases e fosfatase que através de eventos de fosforilação e desfosforilação controlam os processos celulares. Além do MPF, outras quinases como *mitogen activate protein kinase* (MAPK) também estão envolvidas na maturação ovocitária. Em animais domésticos a MAPK é ativada no rompimento da VG e tem inúmeros alvos no núcleo e citoplasma, incluindo proteína do citoesqueleto (Gonçalves, 2001).

Na maturação nuclear, ocorre a reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação de cromossomos e a progressão da meiose que estava em PI para o estágio de metáfase II (MII) (van den Hurk & Zhao, 2005). Os ovócitos ficam retidos em MII até a fecundação ou a ativação partenogenética. A maturação citoplasmática, cujo mecanismo ainda não está tão esclarecido como da maturação nuclear, (Sirard et al., 2006) consiste em uma reorganização e aumento de organelas (ribossomos, mitocôndrias, grânulos da cortical) e também a reprogramação da síntese protéica. A retomada da meiose induz a inativação da transcrição e imediatamente limita o programa molecular do ovócito requerido para passar a MZT. Portanto, a maturação molecular se refere à síntese e acúmulo de RNAs e proteínas de origem materna, os quais são necessários não só para o crescimento e maturação, mas, especialmente, para o desenvolvimento embrionário inicial (Dode, 2006; Sirard et al.,2006).

O ovócito totalmente crescido, apesar de ter condições de sofrer a maturação, ele permanece retido em PI até o pico de LH ou a retirada do folículo. A retenção meiótica é regulada pelos níveis de AMPc, sendo que altos níveis dentro do ovócito previnem a retomada prematura (van der Hurk & Zhao.,2005). Esses altos níveis de AMPc no ovócito resultam na fosforilação do p34cdc2 na treonina 14 e tirosina 15 tornado-o inativo (Mehlmann,2005).

In vivo, a retomada da meiose ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório do LH que se completa no bovino 24 h após o pico desse hormônio com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e a retenção do ovócito em MII (van den Hurk & Zhao, 2005). O LH induz a maturação agindo nas células da granulosa que liberam um sinal que é transferido para o ovócitos causando a diminuição do AMPc intraovocitário, necessário para retomada da meiose (van der Hurk & Zhao.,2005). Existem evidências que o LH regula o AMPc intracelular, diminuindo a síntese ou aumentando a degradação, por inibir o sistema ligado a adenilciclase ou estimulando a fosfodiesterase (Norris et al., 2007). Além disso, outros fatores tais como mudança da permeabilidade das junções GAP parecem estar envolvida (van der Hurk & Zhao, 2005).

O LH nas células do *cummulus* também ativa o *growth differentiation factor-9* (GDF9) que induz a secreção do ácido hialurônico que se deposita entre as células do *cummulus* e forma uma matriz extra-celular muco-elástica causando a expansão dessas células. Essa matriz é importante para facilitar a captura do ovócito liberado do folículo dominante, pelas fimbrias do oviduto, além de ser uma importante barreira seletiva para espermatozóides. O GDF9 também induz a formação da *cyclooxygenase-2* (COX-2) nas células da granulosa que é essencial para síntese da prostaglandina E2, um componente importante para expansão das células do *cummulus* e para ovulação (van den Hurk & Zhao, 2005).

No processo de MIV, os ovócitos ainda imaturos retomam a meiose assim que são retirados do ambiente folicular (Bever & Izadyar, 2002; Lonergan et al.,2003) por serem privados de substâncias inibitórias presentes no líquido folicular (Sirard et al., 2006). Sendo assim, os ovócitos precisam ser colocados rapidamente em meio de cultivo adequado. A obtenção de ovócitos imaturos pode ser realizada através da punção de ovários provenientes de abatedouro ou pela aspiração ovariana guiada por ultra-som em animais vivos. Em geral os ovócitos são obtidos de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro. Isso porque está estabelecido que só os ovócitos que atingem o seu crescimento total podem ser competentes. O crescimento do ovócito se completa quando o folículo tem em torno de 2 mm. Portanto, ovócitos provenientes de folículos menores que 2 mm seriam incompetentes para completar a maturação e terem o

desenvolvimento embrionário normal (Yang et al., 199; Lonergan et al., 1994; Lequarre et al., 2005).

A MIV de ovócitos bovinos ainda é ineficiente, pois a porcentagem de blastocistos oriundos destes ovócitos ainda é baixa (30-40%) quando comparados aos ovócitos maturados *in vivo* (Kane et al., 2003). Vários fatores afetam o sucesso da MIV entre eles pode-se mencionar, além do tamanho, a qualidade do folículo, a morfologia das células do *cummulus* e o meio de cultivo. Com relação ao folículo, o grau de apoptose pode afetar o ovócito, visto que um grande número de folículos que entrariam em atresia são utilizados na PIV (Saumande, 1991). Por outro lado, o grau de atresia inicial e/ou moderada na célula do *cummulus* está associando ao sucesso da competência do ovócito. A morfologia das células do *cummulus* geralmente utilizada para selecionar os COCs, está relacionada com a capacidade para produzir embriões. A qualidade das células do *cummulus* é essencial, pois elas possuem um papel importante para a maturação citoplasmática do ovócito através do fornecimento de carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos (Nagano et al., 2006; Rodriguez & Farin, 2004). A interação do ovócito com a célula do *cummulus* ocorre através das ligações tipo *gap* que são compostas de proteínas tipo conexinas que aparecem em ovócitos após a formação dos folículos secundários. Portanto, o rompimento das junções tipo *gap*, afetaria a maturação do ovócito (Nagano et al., 2006). A aparência do citoplasma do ovócito também pode ser um fator determinante para o sucesso da MIV. O citoplasma amarronzado homogêneo apresenta uma alta taxa de fecundação, clivagem e blastocistos em relação ao grupo de ovócitos com citoplasma preto e pálido (Nagano et al., 2006).

O estabelecimento de um meio de maturação eficiente que promova uma correta maturação é um importante fator e, certamente, interfere nas demais etapas da PIV. Para a MIV de ovócito de bovino normalmente utiliza-se o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199) com sais de EARLE'S. Alguns grupos de pesquisa têm utilizado *synthetic oviductal fluid* (SOF) que normalmente é utilizado para cultivo de embrião. Lonergan et al. (2004) verificaram que o SOF é capaz de promover maturação ovocitária na ausência de macromoléculas. Em contrapartida Russell et al. (2006) mostraram que ovócitos maturados em meio SOF geraram embriões de qualidade inferior do que aqueles maturados em meio TCM-199. Estes meios padrões podem ser modificados de acordo com os protocolos de cada

laboratório, podendo ser suplementados com: fonte de energia, glicose e piruvato; fonte protéica, soro fetal bovino e BSA ou macromoléculas sintéticas, ácoolpolivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) (Ali & Sirard, 2002); bicarbonato de sódio; L-glutamina; hormônios LH e FSH (Gonçalves, et al., 2001; Sirard et al.,2007), antioxidantes; *epidermal growth factor* (EGF) e *insulin-like growth factor* (IGF) (Makarevich & Markkula, 2002). Pode-se também acrescentar ao meio de maturação substâncias (roscovitne, butirolactona-I) que retêm a meiose com a função de aumentar o tempo para completar a maturação citoplasmática do ovócito *in vitro*, e conseqüentemente, melhorar sua competência (Rodriguez & Farin, 2004). Além disso, o pH e a osmolaridade do meio, assim como a temperatura da estufa e a tensão de O₂ também afetam o sucesso da MIV (Nagai, 2001).

A etapa seguinte à MIV na PIV de embriões bovinos é a FIV, em que seu sucesso, depende além da qualidade de ovócitos da procedência dos espermatozóides que serão utilizados (Hansen,2006).

Os primeiros experimentos com FIV de mamíferos ocorreram no final do século XIX. Cientistas interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram os primeiros ensaios com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem as manipulações de embriões. A tecnologia da FIV nos mamíferos foi baseada na observação da fecundação de ovócito de estrela do mar há mais de um século (Galuppo, 2005). Somente em 1981 foi produzido o primeiro bezerro sadio pela FIV (Brackett et al., 1982), a partir de então, a PIV de bovinos recebeu um grande impulso.

O processo de fecundação do ovócito envolve uma seqüência complexa de eventos. Inicialmente, o espermatozóide precisa de motilidade para se aproximar do ovócito, além de sofrer o processo de capacitação e reação acrossômica (RA). Somente espermatozóides capacitados se ligam aos receptores da ZP2 e desta forma se preparam para a penetração da zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do ovócito. Posteriormente, à ligação com a ZP2 os espermatozóides sofrem a RA e se ligam ao receptor ZP3 (Silva, 1998). A penetração do espermatozóide no ovócito ocorre após ação de enzimas liberadas na RA que digerem a zona pelúcida auxiliada pela sua motilidade. A fusão do espermatozóide

com a membrana do ovócito ocorre no espaço periviteliníco e desta forma o espermatozóide é incorporado ao ooplasma (Flesch & Gadella, 2000; Gonçalves et al, 2001). O ovócito ativado pelo espermatozóide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais e síntese protéica (Gonçalves et al., 2001).

Para evitar a penetração de mais de um espermatozóide, ocorre o bloqueio primário ou vitelínico devido à rápida despolarização da membrana. O bloqueio secundário ocorre logo após, onde conteúdo dos grânulos corticais, enzimas hidrolíticas, proteinases e peroxidases, são liberadas em toda a superfície do ovócito provocando a hidrólise parcial das proteínas da zona pelúcida. Com essas modificações a zona pelúcida perde todos seus receptores espermáticos, impedindo a penetração de outros espermatozóides que provocariam a poliespermia e impediriam o desenvolvimento embrionário normal (Gonçalves et al., 2001).

Após a penetração espermática, a segunda divisão meiótica do ovócito se completa e os cromossomos, que permanecem, são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino. Concomitantemente, a membrana nuclear do espermatozóide se desintegra, a cromatina nuclear descondensa e ocorre a formação de nova membrana nuclear que envolve os cromossomos paternos, formando o pró-núcleo masculino. Os microfilamentos presentes no córtex do ovócito são responsáveis pela migração dos pró-núcleos para o centro do citoplasma do ovócito onde ocorre a singamia e formação de um núcleo diplóide que originará um novo indivíduo (Gonçalves et al., 2001).

O co-cultivo do espermatozóide e ovócitos é realizado por um período de 12 a 18 horas (Dode et al., 2002), a uma temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os espermatozóides são adicionados às gotas de fecundação contendo os ovócitos a uma concentração final que pode variar de 1x10⁶ a 1x10⁷ espermatozóides/ml de meio. A adição de penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) e heparina ao meio FERT-TALP tem sido utilizada pela maioria dos laboratórios com a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, melhorando os índices de fecundação (Gonçalves et al., 2001).

Atualmente, o protocolo da FIV que utiliza o sêmen não sexado vem sendo modificado devido ao aumento na utilização de sêmen sexado (Dell'Aqua et al., 2006). Essa modificação para o sêmen sexado é necessária, pois seus parâmetros apresentam características próprias como baixa motilidade pós-descongelamento (Palma et al., 2008) e baixa taxa de blastocisto quando se compara quando se utiliza o sêmen não sexado (Wilson et al., 2006). As alterações propostas basicamente estão relacionadas ao procedimento de seleção espermática, que é efetuada por centrifugação em gradientes de densidade de *Percoll*, em microcentrífuga de alta rotação, diminuindo o tempo de centrifugação e o volume de *Percoll* geralmente utilizado na FIV com sêmen convencional (Dell'Aqua et al., 2006). Essa alta rotação visa recuperar um maior número de células, proporcionando melhor aproveitamento da dose comercial de sêmen sexado que varia de 1×10^6 – 3×10^6 espermatozoides por palheta (Seidel & Johnson et al., 1999).

Após a fecundação os possíveis zigotos são transferidos para meio de cultivo onde permanecem até atingir o estágio de blastocisto. O meio de cultivo de embriões *in vitro* (CIV) deve atender suas exigências para que sua qualidade não seja comprometida. Este período tão importante inclui: as primeiras clivagens, a ativação do genoma embrionário quando o embrião possui de 8 a 16 células; a compactação da mórula no dia 5 de desenvolvimento, que envolve o estabelecimento do contato célula-célula; e a formação do blastocisto nos dias 6-7, o qual envolve a diferenciação de dois tipos de células, o trofoectoderma e a massa celular interna (MCI). Qualquer modificação no ambiente de cultivo embrionário pode afetar uma ou todas essas etapas podendo interferir na qualidade embrionária (Lonergan et al., 2003).

Para o CIV de embriões vários meios podem ser utilizados SOF, meio de cultivo celular (TCM), meio Ham's F – 10, *Garner's G1/G2* e *hamster embryo culture medium* (HECM-6) com acréscimo de proteínas, substrato energéticos, aminoácidos essenciais e não essenciais e inositol. O uso de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo de embrião, como fonte protéica, tem sido considerado como responsável por anormalidades fetais e placentárias, pelo excesso de peso de bezerros (síndrome de bezerros grande) gerando distocias (Hoshi, 2003). Conseqüentemente, novas substâncias estão sendo utilizadas com o objetivo de substituí-lo como a albumina sérica bovina (BSA), ou as macromoléculas: como

álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP) (Enright et al., 2000). Apesar da presença de SFB no meio SOF promover uma taxa superior de blastocistos (47,5%) em relação aos meios que não utilizam o SFB (28,3%) (Gutiérrez-Adán et al., 2001), ainda não se sabe se a concentração de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas que estão presentes no SFB pode variar entre os lotes e afetar de forma variada o desenvolvimento dos embriões PIV. A fonte energética requerida para suprir as necessidades do embrião nas primeiras clivagens até a formação de 16-32 células é o lactato e piruvato. Após a compactação e formação da blastocela, quando se inicia a diferenciação das células do embrião precisa-se utilizar a glicose como substrato energético (Rieger et al., 1992). Atualmente, diversos sistemas vêm sendo empregados com o objetivo de mimetizar ao máximo as condições uterinas, melhorando a taxa de PIV de embrião. Thibodeux et al. (1992) realizaram o co-cultivo com células somáticas de trato reprodutivo feminino, tais como células do oviduto, junto a embriões bovinos. O efeito positivo dessa interação das células somáticas com embrião está atribuído à secreção de fatores embriotróficos que favorecem o desenvolvimento embrionário. A composição do meio junto às fontes protéicas já citadas exerce um efeito na morfologia das células do embrião e na expressão de alguns genes (Rief et al., 2002). Tem sido mostrado por vários autores o cultivo de embriões bovinos em oviduto de ovelhas como sendo um método adequado para o desenvolvimento de embriões do estágio de zigoto a blastocisto. A vantagem desse sistema *in vivo* é a capacidade de produzir grande número de embriões em ambientes próximo ao *in vivo*, proporcionando melhoras significativas em relação ao cultivo *in vitro* (Lonergan, 2008).

Além da qualidade de ovócitos e, do ambiente de cultivo outro fator importante que afeta o sucesso da PIV é o touro, que é grande fonte de variação. Palma & Sinowatz (2004) utilizaram na PIV sêmen de 63 touros que na inseminação artificial (IA) apresentaram taxa de prenhez aos 60-90 dias de 65-75% e obtiveram taxa de blastocisto variando de 6,9% a 51,2%. Grande variação entre touros quanto à PIV de embriões também tem sido demonstrado por vários autores (Agung et al., 2006; Cesari et al., 2006; Alomar et al., 2008).

3.5. Sexo de embriões bovinos na produção *in vitro*

Para identificação do sexo dos embriões, algumas técnicas têm sido descritas. Os métodos podem ser divididos em duas categorias: não invasivos, como a quantificação de enzimas ligadas ao cromossomo X e testes imunológicos, e os invasivos, que incluem análise citogenética, e o método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Gardón et al., 2004).

Algumas enzimas como a glicose 6 fostato desidrogenase (G6PD), a fosforibosiltransferase da hipoxantina-guanina (HPTR) são codificadas por genes localizados no cromossomo X. Durante o desenvolvimento embrionário, quando os cromossomos X estão ativos, os níveis de expressão destas enzimas estão mais elevados quando comparado ao sexo masculino. Baseado nisto, este método consiste em determinar o sexo dos embriões por meio da análise da atividade de tais enzimas. A utilização da dosagem de enzimas como método de determinação do sexo dos embriões está restrito a um período compreendido desde o momento da ativação do genoma embrionário até o momento em que os dois cromossomos X permanecem ativos (Pegoraro & Hossepian Lima, 2001). O processo consiste no cultivo de embriões em meio contendo uma enzima ligada ao cromossomo X, a co-enzima e um corante. Os embriões, após o cultivo, são classificados de acordo com a intensidade da coloração como sendo embriões machos (pouco corados) e embriões fêmeas (fortemente corados) (Monk et al., 1990). Como ainda não é conhecido o período exato da inativação do cromossomo X nos mamíferos domésticos, pode-se diagnosticar erroneamente embriões fêmeas como machos devido a inativação precoce do cromossomo X.

Já a detecção do antígeno H-Y em mamíferos está restrita aos embriões do sexo masculino, que expressam esse antígeno na membrana dos seus blastômeros podendo ser detectado pelo método de citotoxicidade e imunofluorescência indireta. A técnica de citotoxicidade se baseia no cultivo de embriões em meio quimicamente definido, contendo

anticorpos anti H-Y. Posteriormente, adiciona-se soro ao meio de cultivo, cuja função é catalisar a reação de lise das células onde ocorreram a união do anticorpo anti H-Y e o antígeno H-Y. Portanto, são considerados do sexo feminino os embriões que se desenvolvem *in vitro* (Gardón et al., 2004). A técnica de imunofluorescência indireta foi desenvolvida para detecção de antígeno H-Y em células somáticas. Os embriões são cultivados em meio de cultivo contendo anticorpos anti H-Y. Em seguida transfere os embriões para meios de cultivo contendo anticorpos anti-imunoglobulinas que são marcados com isotiocinato de fluorescência (FITIC) (Pegoraro & Hossepian Lima, 2001). A desvantagem dos métodos imunológicos é que sua acuidade não excede 87%. Um dos motivos é que o antígeno H-Y não seria um antígeno específico do sexo podendo resultar em reações cruzadas com outros antígenos presentes na superfície celular (Van Vliet et al., 1989).

Os primeiros estudos de embriões sexados por meio da análise citogenética utilizaram colorações de células embrionárias com acetato deorceína para avaliar a presença do corpúsculo de Barr (CB). O corpúsculo de Barr é formado pelo cromossomo X inativo em células de fêmeas sendo um indicador confiável do sexo em animais. Portanto, a natureza granular do citoplasma pode dificultar a observação do corpúsculo, influenciando o diagnóstico para machos devido à ausência do CB. Com os avanços das técnicas de micromanipulação facilitou a sexagem de embriões por meio de cariótipo. Biópsias de blastômeros são realizadas com micromanipuladores e colocadas em cultivo para sincronização do ciclo celular na fase de metáfase da mitose, pois nessa fase é possível a identificação dos pares de cromossomos sexuais XX e XY. O dimorfismo que existe entre os cromossomos sexuais é fundamental para determinação do sexo. Os bovinos contêm 60 cromossomos em células diplóides sendo um cromossomo grande submetacêntrico X, um pequeno metacêntrico Y e 58 cromossomos restantes acrocêntricos. Apesar da acuidade do teste ser alta, aproximando-se de 100%, a desvantagem dessa técnica ocorre devido à dificuldade de obter biópsias que possam ser preparadas de forma adequada para análise citogenética (Pegoraro & Hossepian Lima, 2001).

A técnica de PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Para delimitar a região do DNA genômico utiliza-se um par de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores

específico para região. Após o PCR, a amostra é aplicada em gel de agarose e submetida à eletroforese. Para sexagem são utilizados um par de *primers* Y-específicos e um par de *primers* específicos para sequência genômica presentes nos dois sexos. (Pegoraro & Hossepian Lima, 2001). Estudos que utilizam esse método revelam que acuidade é alta, próxima de 100%, e o número de células retiradas não necessita ser elevado. Normalmente este número é inferior ao requerido para análise citogenética. A eficiência dessa técnica para detecção do sexo de embriões PIV no bovino é de 95,6% (Sousa, 2007).

Esses diferentes métodos de sexagem de embriões têm sido utilizados em diversas linhas de pesquisa da PIV que visam estudar o desenvolvimento embrionário entre os sexos. Sendo que o mais utilizado entre eles é a técnica de PCR. Existem relatos que embriões PIV machos se desenvolvem mais rapidamente que embriões fêmeas durante os primeiros 7 a 8 dias após a fecundação, sugerindo que o sexo está relacionado com alteração de expressão de genes entre os gêneros após a ativação genômica (Gutiérrez-Adán et al., 2001). Há controvérsias quanto ao efeito da utilização do SFB no meio de cultivo de embriões na proporção macho:fêmea. Para Gutiérrez-Adán et al. (2001) o SFB proporcionou maior porcentagem de embriões machos em relação às fêmeas em um curto período de cultivo (D6), sendo que a proporção se igualou no dia 9 pós-fecundação. Já Gilardi et al. (2004) observaram que a presença de SFB e BSA no meio de cultivo não interferiu na proporção do sexo dos embriões. A glicose no meio de cultivo embrionário exacerba a diferença de desenvolvimento entre embriões machos e fêmeas, sendo que entre aqueles mais adiantados durante o cultivo a maior porcentagem é macho (Rheingantz et al., 2004). A duração da co-incubação de espermatozoides com ovócito também influencia a proporção dos sexos de embriões PIV, sendo que a co-incubação durante 6h resultou em uma maior porcentagem de embriões machos quando comparado com o período de 9,12 e 18h (Kochhar et al., 2003). O método de preparação de sêmen antes da FIV também pode interferir no sexo de embriões, o *swim up* resultou em maior proporção de embriões machos (58,4%) em relação ao gradiente de *Percoll* (46,4%) (Rheingantz et al.2004; Rheingantz et al.,2006). Avery et al. (1992) utilizando o *swim up* e mostraram que 60% dos embriões em D7 de cultivo eram do sexo masculino. Além disso, o efeito de touro afetando a relação macho e fêmea também tem sido relatado. Alomar et al. (2008) verificaram que um touro entre os quatro avaliados produziu mais de 70% de embriões machos. A proporção de blastocistos machos também aumentou com o aumento do

tempo de maturação dos ovócitos para 34 h em relação aqueles maturados por 16 e 22h (Agung et al., 2006).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNG, B.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, R.; WATARY, H.; NAGAI, T. Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, p.123-127, 2006.
- ALI, A., SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, p.901-905, 2002.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.48-61, 2008.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995.
- AX, R.L.; DALLY, M.; DIDION, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Avaliação do semen. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7 ed. São Paulo: Manole, 2004, p.369-394.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University, press, 1989. 285 p.
- BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, p.173-178, 2002.

- BRACKETT, B.G.; BOUSUQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.L.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A. R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.3/4, p.179-187, 2005.
- CARVALHO, J.; MACHADO, G.; FRANCO, M.; RUMPF, R.; DODE, M. Comparasion of different tecnhiques to evaluate membrane and acrossome integrity of bovine cryopreserved sperm cells. In: XXV JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2008, Budapeste. **Anais: Oral and Poster Abstract, XXV Jubilee World Buiatrics Congress**, n.905, p.205, 2008.
- CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N.; VICENTI, A.;FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.66, p.1185-1193, 2006.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; Jr ALMEIDA, I.L. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, No.2, p.397-402, 2000.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 1998, 2ed., Belo Horizonte, 49p.
- COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction of Domestic Animal**, v.38, p.305-311, 2003.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.
- CROSS, N.L.; WATSON,K. Assessing acrossomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. **Theriogenology**, v.42, p.89-98, 1994.
- CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research Science**, v.42, n.5, p.372-380, 2005.
- DELL' AQUA, JR.A.; PAPA, F.O.; ARAÚJO, JR.J.P.; FREITAS, C.P.; PONCHIROLI, C.B.; FIGUEIREDO, A.S.; MELO, C.M.; ALBERTI, K.; CRESPILO, A.M.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ORLANDI, C.. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.205-212, 2006.
- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34, 2006. **Anais: Acta Scientiae Veterinariae**, Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p.115 – 130, 2006.

- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.207-214, 2000.
- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNNADES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-23, 2002.
- ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A. YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659-673, 2000.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.
- EVERSON, D.P.; WIXON, R. Clinical aspect of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v.65, p.979-991, 2006.
- FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* produced embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178-191, 2006.
- FERNANDES, C.E.S.; DODE, M.A.N.; PEREIRA, D.; SILVA, A.E.D.F **Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilizing ability** **Theriogenology**, 2008, in press.
- FLESCH, F.M. & GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.197-235, 2000.
- GALUPPO, A.G. **Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos a *Brucella Abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações de embriões-patógenos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, 2005.
- GARDÓN, J.C.; AGUERA, S.; CASTEJÓN, F. Sexing *in vitro* produced bovine embryos, at different stages of development, using rat H-Y antiserum. **Theriogenology**, v.62, p.35-43, 2004.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004, p.97-110.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of invitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.201-214, 2008.
- GILARDI, S.G.T.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; MACHADO, M.A.; SERAPIÃO, R.V.; SOARES, A.B.M.; PINHO, T.G.; VIANA, J.H.M. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.623-627, 2004.

- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L.F.S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 1 ed, p.195-226, 2001.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117-1125, 2001.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.
- HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v.65, p.119-125, 2006.
- HAFEZ, E. S. E. Avaliação de sêmen. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 6ed. São Paulo: Manole, 1995, p.411-430.
- HENKEL, R. & SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.1, 2003.
- HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryos transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.
- IBGE, 2006. Disponível em: www.ibeg.org.br. Acesso em: 21 de outubro de 2008.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L.; RODRIQUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans *in vitro* and non return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction Domestic Animal**, v.35, p.207-212, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality trough fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation of field fertility of frozen-thawed semen form Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v.55, p.974-981, 2001.
- KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potencial impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.171-190, 2003.
- KOCHHAR, H.S.; KOCHHAR, K.P.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.33-49, 2003.
- LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristic and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, p. 841-859, 2005.
- LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined condition. **Reproduction of Nutrition and Development**, v.34, p.329-339, 1994.

- LONERGAN, P.; FAIR, T. In-vitro produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture condionts and gene expression patterns. **Reproduction of Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003.
- LONERGAN, P.; PEDERSEN, H.G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P.D.; FAIR, T. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocyst. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1096-1100, 2004.
- LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenoly**, v.57, n.5, p.1467-1483, 2002.
- MARTINS, C.F.; DODE, M.A.N.; BÁO, S.N.; RUMPF, R. Método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*): uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozóides bovinos. **Série Documento Embrapa**, v.192, 2007, 26p.
- MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Appoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factos I during *in vitro* maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v.66, p.386-392, 2002.
- MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p.791 – 799, 2005.
- MONK, M.; HANDYSIDE, A.H.; MUGGLETON-HARRIS, A.; WHITTINGHAM, D. Preimplantaion sexing and diagnosis of hypoxanthine phosphoribosyl tranferase deficiency in mice by biochemical microassay. **American Journal Medical Genetics**, v.35, n.2, p. 201-205, 1990.
- MOOHAN, J.M.; LINDSAY, K.S. Spermatozoa selected by discontinuous *Percoll* density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. **Fertility Sterility**, v.64, p.160-165, 1995 (abstract).
- NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.
- NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. **Zygote**, v.14, p.53-61, 2006.
- NAGY, S.; HÁZAS, G.; PAPP, A.B.; IVÁNCSECS, J.; SZÁSZ,F.; Jr S. F.; KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. **Theriogenology**, v.52, p.1153-1159, 1999.
- NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e “acridine orange”. **Bioscience Journal**, v.20, n.3, p.117-124, 2004.

- NEILD, D.N.; GADELLA, B.M.; AGUERO, A.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrossome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.47-56, 2005.
- NORRIS, R.P.; FREUDZON, L.; FREUDZON, M., HAND, A.R.; MEHLMANN, L.M.; JAFFE, L.A. A Gs-linked receptor maintains meiotic arrest in mouse oocyte, but luteinizing hormone does not cause meiotic resumption by terminating receptor-Gs signaling. **Developmental Biology**, v.310, p.240-249, 2007.
- PACHECO, A.; QUIRINO, C.R.; SILVA, J.F.S.; CUNHA, I.C.N.; BUCHER, C.H. Efeito da idade e de fazenda sobre as características seminais e perímetro escrotal em touros da raça Guzará criados no norte e noroeste do Rio de Janeiro/Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.15, n.4, p.157-165, 2007.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMULLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. **Anatomy Histology and Embryology**, v.37, p. 67-73, 2008.
- PALMA, G.A.SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomy, Histology and Embryology**, v.33, p.257-262, 2004.
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**. v.44, p.859-869, 1995.
- PEGORARO, L.M.C.; HOSSPEPIAN LIMA, V.F.M. Selección del sexo em mamíferos. In: PALMA, G.A. **Biología de la Reproducción**, 1 ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2001. p317-351.
- PILIP, R.; DEL CAMPO, M.R.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. *In vitro* fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. **Theriogenology**, v.46, p.1-12, 1995.
- PIMENTEL, C.A. Patologia espermática e anormalidades genitais em touros. In: SILVA, A.E.D.F.; MARTINS, C.F.; ZUCARI, C.E.S.N.; PIMENTEL, C.A.; DODE, M.A.N.; MELO, N.S.S. **Curso de Andrologia**. Brasília: EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, p.71-88.
- PRAKASH, P.; LEYKIN, L.; CHEN, Z.; TOTH, T.; SAYEGH, R.; SCHIFF, I.; ISAACSON, K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology. **Fertility and Sterility**, v.69, n.4, 1998.
- RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por *Swim-up* ou Gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.32-39, 2004.
- RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. The sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos

- is affected by the method of sperm preparation. **Animal Reproduction**, v.3, n.4, p.423-430, 2006.
- RIEF, S.; SINOWATZ, F.; STOJKOVIC, M.; EINSPANIER, R.; WOLF, E.; PRELLE, K. Effects of novel co culture system development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.124, p.543-556, 2002.
- RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.585-505, 1992.
- RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.55-67, 2004.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARRSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction Fertility Development**, v.9, p.297-308, 1997.
- RUSSELL, D.F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRIC, J.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.237-247, 2006.
- SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; SEPÚLVEDA, G.; PEÑA, P.; MISKA, W. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. **Theriogenology**, v.43, p.761-768, 1995.
- SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Recueil de Medecine Veterinaire.**, 167 (3/4): 205-218, 1991.
- SEIDEL Jr., G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm - overview. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1267-72, 1999.
- SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Germ cells and fertilization**, 1993, p. 63-101.
- SHUFFNER, A.; PLÁCIDO. T. A importância do espermatozoide no desenvolvimento embrionário pré-implantacional. **Revista Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Paraná**. Disponível: <http://www.sogipa.org.br/artigos/detail.asp?iPic=102&iType=40>, acesso em: 24/11/2008.
- SILVA, A.E.D.F.; Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Série Documentos**, nº35, 1998. 37p.

- SILVA, A.E.D.F.; MARTINS, C.F.; ZUCARI, C.E.S.N.; PIMENTEL, C.A.; DODE, M.A.N.; MELO, N.S.S. **Curso de Andrologia**. Brasília: EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, p.167-177, apostila.
- SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1890-1900, 2003.
- SILVA, P.F.N.; GADELHA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and development competence. **Theriogenology**, v.68S, p.S71-S-76, 2007.
- SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, Á.B.; IVÁNCICS, J.; BARANYAI, B.; GÓCZA, E.; KOVÁCS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.285-290, 2002.
- SOUSA, REGIVALDO VIEIRA. **Efeito da micromanipulação para identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007, 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; ATERCKY, V.; MAES, D.; KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction of Domestic Animal**, v.73, p.127-132, 2002.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.
- THIBODEAUX, J. K.; MÉNÉZO, Y.; ROUSSEL, J. D.; HANSEL, W.; GOODEAUX, L. L.; THOMPSON, D. L. Jr.; GODKE, R. A. Coculture of *in vitro* fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1448 – 1455, 1992.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J.; BARTH, A.D. An investigation of the fertilization characteristic of pyriform-shaped bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.35-50, 1999.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Plasma membrane and acrossomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrossome defect. **Theriogenology**, v.58, p. 87-102, 2002.

- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, 2005, p.1717-1751.
- VAN VLIET, R.A.; VERRINDER GIBBINS, A.M.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.32, n.3, p.421-438, 1989.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 35, 2007. **Anais: Acta Scientiae Veterinariae**, Salvador: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p.s915-s.919, 2007.
- WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 4, p. 554-563, 2004.
- WILSON, RD, FRICKE PM, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, RUTLEDGE JJ, SYVERSON PENFIELD CM, WEIGEL KA. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, p.1007-1015, 2006.
- YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, eds. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press; 1994: p.189–317.
- YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI ,H.; TANEJA, M.; BOLS ,P.E.J; PRESICCE, G.A. Control f oocyte maturation in cows –biological factors. **Theriogenology**, v.49, 1998, p.471-482.
- ZÚCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A.; SCALDELAI, P.R.R.;RODOVALHO, N.C.M.;ZANEGA, C.A.; KIEFER, C.; SILVA, E.V.C. Seleção em gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**,v.9, n.2, p.358-366, 2008.

CAPÍTULO 2

1. RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do volume de *Percoll*, tempo e força de centrifugação na qualidade das características espermáticas, desenvolvimento e sexo dos embriões produzidos *in vitro*. Sêmen congelado de quatro touros foi submetido à três procedimentos diferentes de *Percoll*: T1 – 4ml de *Percoll*, centrifugado por 20 minutos a 700 g, T2 – 800 µl de *Percoll* centrifugado por 20 min a 700 g e T3 – 800 µl de *Percoll* centrifugado por 5 min a 5000 g. O sêmen foi avaliado antes e após os tratamentos com *Percoll* quanto a motilidade, morfologia, integridade de acrossoma, de membrana e de cromatina. Posteriormente, o sêmen foi utilizado para FIV de ovócitos maturados *in vitro*. Todos os tratamentos com o *Percoll* melhoraram a proporção de espermatozóides móveis. Nenhum efeito de tratamento foi detectado nas características espermáticas avaliadas ($P>0,05$), entretanto diferenças quanto ao efeito de touro foram observadas em todos os parâmetros testados. Da mesma forma, a taxa de clivagem e blastocisto não foi afetada pelo procedimento do *Percoll* ($P>0,05$), mas foi influenciada pelo touro ($P<0,05$). O touro 4 apresentou baixa produção total de blastocisto ($n=5$), sendo eliminado da análise. A relação dos sexos foi similar em todos os tratamentos para os touros 2 e 3. O touro 1 no T1 apresentou maior porcentagem de embriões machos. Porém, quando somente os tratamentos foram considerados, independente do touro, nenhuma diferença na proporção macho:fêmea foi encontrada quando se comparou a proporção esperada de 1:1. Os resultados indicam que o decréscimo do volume de *Percoll*, a redução do tempo de centrifugação e alta força de centrifugação não tiveram efeito na qualidade espermática, no desenvolvimento embrionário e na proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras chaves: força e tempo de centrifugação, seleção espermática, desenvolvimento embrionário e proporção de sexo.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of volumes of *Percoll*, time and force of centrifugation on sperm quality characteristics, embryo development and sex ratio of *in vitro* produced embryos. Frozen-thawed semen from four bulls were submitted to three different *Percoll* procedures: T1 - 4 mL of *Percoll*, centrifuged for 20 min at 700 g, T2 - 800 μ L of *Percoll* centrifuged for 20 min at 700 g and T3 - 800 μ L of *Percoll* centrifuged for 5 min at 5000 g. Semen was evaluated before and after *Percoll* treatment for sperm total motility, morphology and integrity of acrosome, membrane and chromatin. Then, semen was used for *in vitro* fertilization (IVF) of *in vitro* matured oocytes. All *Percoll* methods significantly improved the proportion of motile spermatozoa. No effect of treatment was detected in any of the sperm characteristics ($P>0.05$), however bull-related differences were observed in all parameters tested. Similarly, cleavage and blastocyst rate were not affected by *Percoll* procedure ($P>0.05$) but were affected by sire ($P<0.05$). Sire 4 had very low embryos production ($n=5$), and was eliminated from the analysis. Sex ratio was similar in all treatments for bulls 2 and 3. Bull 1 in T1 presented a greater percentage of male embryos. However, when only treatments were considered, independent of bulls, no difference was found in the proportion male:female compared to 1:1 expected ratio. The results indicate that decreasing *Percoll* volume, reducing time of centrifugation and using a higher force of centrifugation have no negative effect on sperm quality, on development and sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos.

Keywords: force and time of centrifugation, sperm selections, embryo development, sex ratio.

3. INTRODUÇÃO

Métodos para seleção espermática são rotineiramente utilizados na preparação do sêmen para a FIV em várias espécies. Esses procedimentos de seleção antes da FIV são utilizados, normalmente, para melhorar a qualidade espermática e remover o plasma seminal/crioprotetor, e debris celulares (Henkel, et al., 2003). Vários métodos podem ser utilizados na preparação do sêmen para FIV tais como o *swim up*, gradiente de *Percoll* e a lavagem do sêmen por centrifugação. Apesar de estudos mostrarem que não existe diferença entre esses métodos na fecundação (Dode et al., 2002) e na taxa de blastocistos (Avery & Greve, 1995), o gradiente de *Percoll* é o mais utilizados para FIV em bovinos (Cesari et al., 2006, Rheingantz et al., 2006; Alomar et al., 2008).

Com o avanço e aumento da utilização do sêmen sexado mudanças no protocolo do *Percoll* para a preparação de células espermáticas têm sido propostas (Dell'Aqua et al., 2006). Tais mudanças são necessárias porque as amostras de sêmen sexado apresentam baixa concentração por palheta, baixa motilidade pós-descogelamento (Palma et al., 2008) e baixa taxa de blastocisto quando comparado ao sêmen não sexado (Wilson et al., 2006). Basicamente, as modificações propostas são diminuir o volume do *Percoll*, diminuir o tempo e aumentar a força de centrifugação (Dell'Aqua et al., 2006). Se essas mudanças, recomendadas para sêmen sexado, puderem ser aplicadas rotineiramente para preparação espermática de qualquer amostra de sêmen, seria de grande valia para a FIV, não só por reduzir custos, mas também por diminuir o tempo de manipulação. Entretanto, não se sabe se essas mudanças no procedimento do protocolo de *Percoll* afetam a qualidade espermática e a produção de embriões em bovinos. E, especialmente, se esse protocolo modificado causaria desvio na relação do sexo dos embriões PIV, quando o sêmen não sexado é utilizado.

Tem sido relatado na literatura que não só a motilidade (Parrish et al., 1995) é afetada após a seleção espermática pelo *Percoll*, mas também a porcentagem de células com morfologia normal (Prakash et al., 1998), com membrana íntegra (Tanghe et al., 2002) e com acrossoma intacto (Somfai et al., 2002; Cesari et al., 2006). Por outro lado, há evidências de que a força de centrifugação utilizada no gradiente de *Percoll* pode também afetar a motilidade espermática e integridade de membrana em touros (Way et al., 1995) e em carneiros (Gil et al., 2000). Portanto, é possível que mudanças no volume do gradiente de *Percoll* e na força de centrifugação possam influenciar a integridade do acrossoma e da membrana tanto quanto afetam a motilidade dos espermatozoides. Todos esses parâmetros de qualidade são necessários para o sucesso da interação espermatozoides e ovócitos e, conseqüentemente, a fecundação. Portanto, qualquer alteração nessas características pode afetar o resultado final da PIV de embriões.

Por outro lado, está bem estabelecido que os cromossomas X e Y têm diferenças morfológicas tais como o tamanho e o conteúdo de DNA (Parrilla et al., 2004). A diferença no conteúdo total de DNA entre esses espermatozoides causa diferenças no peso e densidade entre eles, o que permite a sua separação por um gradiente de densidade contínuo e/ou descontínuo. De fato, a centrifugação pelo gradiente de *Percoll* tem sido utilizada para separar células espermáticas que possuem o cromossomo X ou Y (Kaneko et al., 1983; Kaneko et al., 1984; Hossepian et al., 2000). Também tem sido observado que mudanças no volume de *Percoll* assim como mudanças no tempo de centrifugação podem favorecer o espermatozoide mais leve ou mais pesado, alterando a relação de espermatozoides contendo o cromossomo X ou o Y no volume final obtido (Hossepian de Lima et al., 2000). Portanto, quando alterações no procedimento do *Percoll* são propostas tornando-se necessário garantir que as mesmas não afetem a produção e o sexo dos embriões.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tempo, velocidade de centrifugação e volume do *Percoll* quanto às características espermáticas, desenvolvimento embrionário e relação entre os sexos de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Ao menos que indicado, os produtos químicos foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA). Todos os meios utilizados para PIV de embriões, meio de maturação, meio de fecundação, meio de lavar espermatozóide (SP-TALP), gradiente de *Percoll* 90% e o meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) foram adquiridos da Nutricell® (Campinas, SP, Brazil).

4.2. Delineamento experimental

Foi utilizado sêmen congelado de quatro touros diferentes (1, 2 ,3 e 4). Somente o touro 1 possuía fertilidade *in vitro* conhecida, e tem sido utilizado por muitos anos como touro referência na PIV de embriões no laboratório da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em cada réplica, três palhetas de cada touro foram descongeladas e formado um *pool* que foi colocado em tubo de centrifuga. Amostras foram retiradas para avaliação espermática e o restante do sêmen foi distribuído igualmente para os tratamentos do *Percoll*.

No primeiro tratamento (T1), as amostras de sêmen foram colocadas sobre o gradiente de *Percoll*, que consistiu de 2 mL de gradiente de *Percoll* 45% e 2 mL de gradiente de *Percoll* 90%, colocados em tubos de centrífuga de 15 ml, onde foram centrifugados a 700 g por 20 min a 30°C em centrífuga refrigerada.

O segundo tratamento (T2) consistiu da centrifugação das amostras de sêmen em um volume total de 800 μL , sendo 400 μL de gradiente de *Percoll* 45% e 400 μL de gradiente de *Percoll* 90%, colocados em microtubo de 2 mL a 700 g por 20 min a 30°C.

No tratamento 3 (T3), amostras de sêmen foram colocadas sobre um volume total de 800 μL , sendo 400 μL de gradiente de *Percoll* 45% e 400 μL de gradiente de *Percoll* 90%, colocados em microtubo de 2 mL a 5.000 g por 5 min.

Após a ressuspensão com meio FIV, as amostras foram retiradas para avaliação dos espermatozóides e outra parte do sêmen utilizado para FIV. Todos os testes para avaliar células espermáticas e a FIV foram repetidas para cada touros em três manipulações independentes.

4.3. Avaliação dos parâmetros espermáticos

Todas as amostras de sêmen foram avaliadas, antes e após os tratamentos com o *Percoll*, quanto à concentração, motilidade total, morfologia, integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e integridade da cromatina.

4.3.1. Avaliação de motilidade, morfologia e concentração espermática

A porcentagem do total de espermatozóides móveis foi determinada subjetivamente. Uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina previamente aquecida e, coberta com uma lamínula, sendo examinada em microscópio de luz em aumento de 40x. A morfologia das células espermática foi avaliada em preparação úmida em microscópio de contraste de fase com um aumento de 1000x de acordo com Barth & Oko (1989). Para esta análise, consideraram-se as seguintes anormalidades: cabeça (formas subdesenvolvidas,

piriforme, delgada, delgada na base, contornos anormais), acrossoma (presença de crateras, rugoso), peça intermediária (fraturada, engrossada, enrolada e hipoplásica), gota citoplasmática proximal, cauda (dobrada, enrolada) e cabeça isolada normal. Foram contadas 200 células e os resultados expressos em percentagem.

A concentração espermática foi determinada no hematocítmetro na diluição 1:200. O resultado foi obtido em células espermáticas/ml. A taxa de recuperação foi calculada de acordo com a fórmula abaixo.

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{(\text{Concentração}_{\text{final}} \times \text{Volume}_{\text{final}})}{(\text{Concentração}_{\text{inicial}} \times \text{Volume}_{\text{inicial}})} \times 100$$

4.3.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática, do acrossoma e da cromatina

A integridade da membrana espermática foi avaliada utilizando 6-carboxi-diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo [(PI), Molecular Probe®, Eugene, Oregon, USA], conforme a descrição de Harrison & Vickers, 1990). Amostra de sêmen (10 µl) foi adicionada à solução corante (40 µl) e incubado por 10 min. A solução corante era composta por formol salina (96 ml de solução salina 0,9% e 4 ml de formol 40%), citrato de sódio (3%), PI (0,75 mM), e solução FDA (0,46 mg/ml de dimetil-sulfóxido). Uma alíquota de 5 µl de solução corante com sêmen foi colocada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 494/517 nm excitação/emissão e 536/617 nm excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas por lâmina que foram classificadas de acordo com a membrana espermática em: a) membrana íntegra (coloração verde); b) membrana semi-lesada (cabeça verde e vermelha); c) membrana lesada (coloração vermelha). Para fins de análise utilizaram-se os percentuais de espermatozóides com membrana íntegra.

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de isotiocianato fluorescínico – FITIC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim *peanut agglutinin* – PNA) e PI como foi descrito por Klinc & Rath (2007). Amostra de sêmen descongelada (10 µl) foi diluída em uma solução corante (30 µl) e incubada por 10 min. Esta solução era composta por tampão formol salina, citrato de sódio (3%), PI (0,75 mM) e solução de FITIC-PNA (1 mg/ml em PBS). Uma alíquota de 5 µl de solução corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. Foram examinadas 200 células espermáticas no microscópio de contraste de fase e microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 494/518 nm excitação/emissão). Espermatozoides corados em vermelho com PI foram considerados danificados, na ausência da coloração vermelha eles foram considerados vivos. As células espermáticas vivas foram classificadas como acrossoma reagido se emitissem cor verde fluorescente (FITIC-PNA) ou acrossoma intacto se a coloração fluorescente não estivesse presente.

A integridade de cromatina foi determinada com o uso do corante laranja de acridine (LA). Três esfregaços foram preparados para cada amostra, que após a secagem à temperatura ambiente foram fixados *overnight* em uma solução de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1). Posteriormente, as lâminas foram incubadas na solução tampão (80 mmol/L de ácido cítrico a 15 mmol Na₂HPO₄, pH 2,5) à 75° C por 5 min para testar a estabilidade da cromatina. Subseqüentemente, as lâminas permaneceram por 5 min em uma solução contendo o corante laranja de acridine (0,2 mg/ml), ácido cítrico (0,1 M) e fosfato di-sódio (0,3 M). As lâminas foram avaliadas no mesmo dia utilizando um microscópio epifluorescente (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 490/530 nm excitação/emissão). Para todas as amostras foram avaliadas 200 células por lâmina com aumento de 100x. Espermatozoides com DNA normal apresentavam-se verde fluorescente, enquanto células espermáticas com DNA anormal emitiam fluorescência variando de alaranjado a vermelho.

4.4. Produção de embriões *in vitro*

4.4.1. Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro*

Ovários de vacas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) foram coletados em abatedouro local e transportados em solução salina aquecida (NaCl 0,9%) suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) à 35° C. Complexos *cummulus* ovócito (COC) foram aspirados de folículos de 2-8 mm com escalpes 18G. O líquido folicular aspirado com os COC foi depositado em tubo cônico de 15 ml. Após a sedimentação, os COCs foram recuperados e selecionados com auxílio de estereomicroscópio. Somente COCs que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do *cummulus*, foram utilizados. Os COCs selecionados foram lavados e transferidos, em número de 30-35, para uma gota de 200 µL de meio de maturação sob óleo de silicone e incubados por 22 h à 39°C em 5% de CO₂ em ar.

4.4.2. Procedimentos para seleção espermática

O sêmen de cada touro foi descongelado e as células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* (45-90%). O gradiente de *Percoll* 45% foi preparado com 1 mL de *Percoll* 90% e 1 mL de SP-TALP. O volume de gradiente de *Percoll*, tempo e velocidade de centrifugação foi determinado de acordo com os diferentes tratamentos já citados

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi centrifugado por 5 min em SP-TALP a 700 g (T1 e T2) ou 5.000 g (T3). Posteriormente, o *pellet* resultante foi ressuspendido com 80 µL de SP-TALP e utilizado para avaliação espermática e/ou FIV.

4.4.3. Fecundação *in vitro* e cultivo de embriões

Os ovócitos maturados foram transferidos para gotas de 200 µL de meio de fecundação. Após a centrifugação nos diferentes tratamentos do *Percoll*, foi realizada a contagem dos espermatozoides no hematocítômetro, sendo que a concentração final na gota de fecundação foi de 1×10^6 espermatozoides/mL. Espermatozoides e ovócitos foram co-incubados por 20 h a 39°C com 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o D0.

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de meio SOF suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e cultivados a 39 °C e 5% CO₂ em ar por 7 dias.

Os embriões foram avaliados no D2 pós-inseminação (pi) quanto à clivagem e no D6 e D7 pi para taxa de blastocisto. No D7, somente, blastocisto grau 1 foram individualmente armazenados a - 80°C para determinação do sexo.

4.5. Procedimentos para sexagem dos embriões

A identificação do sexo dos embriões foi determinada pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando dois pares de *primers* diferentes. O primeiro par de *primers* era específico para região do cromossomo Y, enquanto o segundo foi específico de gene autossômico bovino. A seqüência do *primer* e o tamanho do fragmento para cada gene estão

apresentados na tabela 1. A amostra controle do cromossomo X e Y foram originadas de DNA genômico bovino. Inicialmente, os embriões foram expostos por 5 min a 50°C em uma solução lise contendo 1X tampão de PCR, e 15 µg de proteinase K (Invitrogen®) em um volume final de 10 µL; posteriormente a proteinase K foi inativada à 95 °C por 5 min. O PCR foi realizado pela adição, em cada amostra colocadas em microtubos, de mix PCR contendo 20 nM de cada par dos *primers*, 200 µM de dNTP, tampão PCR 1X e 1U Taq Polimerase Platimun® (Invitrogen®), com volume final de 30 µL. O programa do PCR utilizado foi de 40 ciclos de 94°C por 20s, 57°C por 30s e 72°C por 30s, seguido pela extensão final de 72°C por 30 min. A amplificação dos produtos do PCR foi realizada em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando dois *amplicons* foram detectados o embrião foi considerado macho, enquanto a detecção de um *amplicon* foi considerado fêmea (Figura. 1)

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados na sexagem de embriões (**S:** *sense*; **A:** *antisense*) e tamanho, pares de base (pb), dos fragmentos amplificados.

Gene	Sequência do primer	Tamanho do <i>amplicon</i>	Referência
bSRY S	5'-CCTCCCCTTCAAACGCCCGGAATCATT -3'	210 pb	Bondioli et al. 1989
bSRY A	5'-GGCCATAGTCAGGATCTT-3'		
Autossomo S	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG-3'	280 pb	Ellis et al. 1988
Autossomo A	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'		

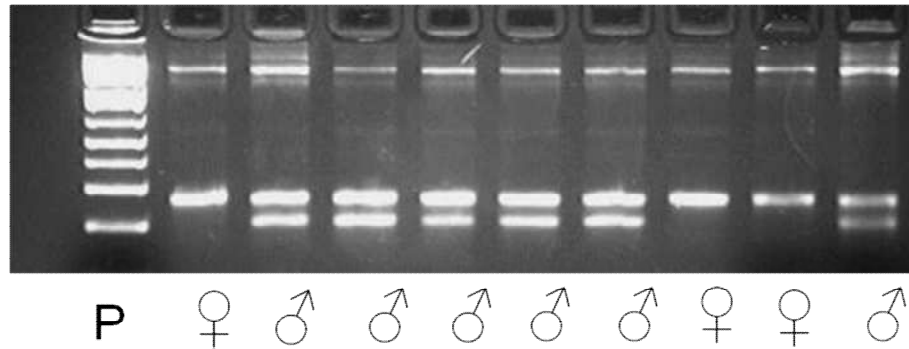


Figura 1 – Identificação do sexo através da amplificação do DNA em gel de agarose. P) marcador de peso molecular; ♀) embrião fêmea, ♂) embrião macho

4.6. Análise estatística

O efeito de tratamento, touro e interação entre eles nas características espermáticas foram analisados por análise de variância (ANOVA) com dois fatores (*two-way* ANOVA) e teste de *Tukey*, (Programa Prophet, versão 5.0; 1997) quando valores apresentavam dentro da normalidade. Caso contrário, os dados foram submetidos ao teste de *Friedman's*, com nível de significância $P < 0,05$.

A taxa de clivagem e blastocisto estão expressas em porcentagem e também foram avaliadas por ANOVA com dois fatores (*two-way* ANOVA) e teste *Tukey* (Programa Prophet, versão 5.0; 1996), no qual foi verificada o efeito de touro, tratamento e interação entre ambos. O teste Qui-quadrado (Programa Prophet, versão 5.0; 1997) foi utilizado para comparar a relação de embriões machos e fêmeas com a frequência esperada de 1:1, para os diferentes tratamentos e touros. A comparação entre os touros e entre os tratamentos para essa proporção também foi realizada pela análise do Qui-quadrado com nível de significância $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados

As características das células espermáticas antes e após a seleção pelo *Percoll* são apresentadas na Tabela 2. Diferenças estatísticas foram observadas para todos os parâmetros de qualidade seminal quando se comparou os resultados obtidos antes a após o tratamento do *Percoll*. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre os três tratamentos para todas as variáveis estudadas. Todos os procedimentos com o *Percoll* melhoraram a proporção de espermatozóides móveis. Uma alta porcentagem de células espermáticas com membrana e acrossoma intacto foi observada após a centrifugação com o *Percoll* para os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Por outro lado, anormalidades morfológicas e integridade de cromatina foram as características que mostraram menores mudanças após os tratamentos com *Percoll*, sendo essa tendência observada para todos os tratamentos.

Tabela 2 – Motilidade total e porcentagem de células espermáticas (média \pm erro padrão) com morfologia normal, membrana, acrossoma e cromatina intactos antes e após a passagem pelo gradiente de *Percoll*.

Tratamento	Motilidade total %	Morfologia normal %	Membrana íntacta %	Vivo com acrossmo intacto %	Cromatina íntacta %
T0	41,3 \pm 3,6 ^a	83,8 \pm 2,3 ^a	44,7 \pm 2,0 ^a	42,8 \pm 2,9 ^a	97,1 \pm 0,5 ^a
T1	76,3 \pm 3,1 ^b	86,6 \pm 2,8 ^{a,b}	56,1 \pm 3,2 ^{a,b}	57,3 \pm 3,3 ^b	98,0 \pm 0,4 ^{a,b}
T2	77,9 \pm 3,8 ^b	89,2 \pm 2,1 ^b	57,6 \pm 4,7 ^b	47,9 \pm 5,2 ^{a,b}	98,2 \pm 0,4 ^b
T3	74,6 \pm 4,0 ^b	88,6 \pm 2,4 ^b	52,3 \pm 3,9 ^{a,b}	46,8 \pm 4,9 ^{a,b}	98,0 \pm 0,5 ^{a,b}

^{a,b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$).

T0 – Avaliação antes da passagem pelo *Percoll*;

T1 – 700 g/20 min em tubos de centrifuga utilizando 2 mL de *Percoll* 45% e 2mL de *Percoll* 90%;

T2 – 700 g/20 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

T3 - 5000 g/5 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

A taxa de recuperação de espermatozóides após o gradiente de *Percoll* foi semelhante ($P > 0,05$) para todos os tratamentos sendo 19,2 (\pm 2,7), 17,0 (\pm 2,9) e 17,3 % (\pm 2,7), para os tratamentos 1,2 e 3, respectivamente.

Embora não se verificou efeito da interação entre tratamentos e touros, e nenhuma diferença entre os tratamentos do *Percoll* para todas as características espermáticas avaliadas, diferença em relação aos touros foi observada para todos os parâmetros testados (Tabela 3). Quando parâmetros de qualidade espermática foram comparados entre touros, independente do tratamento, foi observado que os touros 1 e 2 foram similares para maioria das características, apresentando maior motilidade e porcentagem de células com a cromatina íntacta do que os touros 3 e 4. Em contraste, o touro 3 mostrou os piores valores para todas as características estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Motilidade total e porcentagem de células espermáticas (média \pm erro padrão) com morfologia normal, membrana, acrossoma e cromatina intactos para os quatro touros após o tratamento com o *Percoll*.

Touro	Motilidade total %	Morfologia normal %	Integridade de membrana %	Vivo com acrossmo intacto %	Cromatina intacta %
1	83,9 \pm 2,6 ^a	85,6 \pm 1,5 ^a	64,6 \pm 4,2 ^a	62,2 \pm 4,6 ^a	98,9 \pm 0,3 ^a
2	80,8 \pm 4,2 ^a	94,3 \pm 0,4 ^b	55,5 \pm 2,9 ^{a,b}	55,5 \pm 4,0 ^{a,b}	99,4 \pm 0,2 ^a
3	55,4 \pm 4,6 ^b	77,8 \pm 2,4 ^a	47,9 \pm 5,6 ^b	39,0 \pm 4,5 ^b	96,3 \pm 0,4 ^b
4	60,4 \pm 5,1 ^b	94,7 \pm 0,8 ^b	53,4 \pm 3,6 ^{a,b}	45,9 \pm 4,2 ^{a,b}	97,6 \pm 0,3 ^b

^{a,b} Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$).

As taxas de clivagem e blastocistos para todos os touros e tratamentos estão apresentadas na tabela 4. Os resultados da ANOVA mostraram que não houve efeito dos procedimentos do *Percoll* nessas variáveis. Embora, não tenha ocorrido uma interação entre tratamentos e touros, um efeito significativo foi observado entre touros quanto às taxas de clivagem e blastocistos. Por esse motivo as diferenças entre touros para essas variáveis foram analisadas pelo teste de *Tukey*. Devido a baixa produção total de blastocisto ($n=5$), considerando todos os tratamentos e todas as réplicas, do touro 4 (Tabela 4), ele foi eliminado da análise estatística. A comparação entre os touros mostrou que o touro 1 e 2 apresentaram maior taxa de clivagem e blastocisto do que o touro 3 (Tabela 5).

Tabela 4 – Dados descritivos da taxa de clivagem e blastocisto após a FIV utilizando espermatozoides de quatro touros submetidos a três protocolos diferentes de *Percoll* (média \pm erro padrão - EP).

		Touro 1		
Tratamento	N	Clivagem (% \pm EP)	Blastocisto D6 (% \pm EP)	Blastocisto D7 (% \pm EP)
T1	276	241 (87 \pm 1,47)	70 (28 \pm 4,25)	130 (48 \pm 2,14)
T2	123	100 (82 \pm 4,94)	35 (29 \pm 6,25)	54 (45 \pm 10,74)
T3	113	97 (86 \pm 4,16)	30 (27 \pm 6,51)	49 (44 \pm 6,59)
		Touro 2		
Tratamento	N	Clivagem (% \pm EP)	Blastocisto D6 (% \pm EP)	Blastocisto D7 (% \pm EP)
T1	113	95 (84 \pm 2,65)	17 (16 \pm 4,72)	33 (31 \pm 11,25)
T2	106	91 (86 \pm 1,35)	18 (17 \pm 3,82)	42 (40 \pm 11,12)
T3	121	108 (89 \pm 6,02)	34 (30 \pm 13,71)	55 (46 \pm 14,46)
		Touro 3		
Tratamento	N	Clivagem (% \pm EP)	Blastocisto D6 (% \pm EP)	Blastocisto D7 (% \pm EP)
T1	120	75 (61 \pm 12,68)	9 (7 \pm 3,31)	12 (10 \pm 3,79)
T2	119	73 (60 \pm 11,51)	9 (7 \pm 2,19)	20 (16 \pm 6,02)
T3	103	76 (74 \pm 7,96)	16 (14 \pm 6,55)	27 (26 \pm 9,32)
		Touro 4		
Tratamento	N	Clivagem (% \pm EP)	Blastocisto D6 (% \pm EP)	Blastocisto D7 (% \pm EP)
T1	145	70 (46 \pm 9,84)	2 (1 \pm 0,63)	3 (2 \pm 1,16)
T2	152	65 (42 \pm 5,33)	1 (0,63 \pm 0,63)	2 (1 \pm 0,60)
T3	137	59 (43 \pm 2,74)	0	0

T1 – 700 g/20 min em tubos de centrifuga utilizando 2 mL de *Percoll* 45% e 2mL de *Percoll* 90%;

T2 – 700 g/20 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

T3 - 5000 g/5 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

Tabela 5 – Taxa de clivagem e blastocisto após a FIV utilizando sêmen de três touros diferentes (média \pm erro padrão).

Touro	N	Clivagem D2	Blastocisto D6	Blastocisto D7
1	512	438 (86 \pm 1,6) ^a	135 (28 \pm 2,9) ^a	233 (47 \pm 2,6) ^a
2	340	294 (86 \pm 2,1) ^a	69 (21 \pm 4,9) ^{ab}	130 (39 \pm 6,6) ^a
3	342	222 (65 \pm 5,9) ^b	34 (10 \pm 2,5) ^b	59 (17 \pm 4,2) ^b

^{a,b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$).

Foram produzidos 427 embriões em D7 sendo que um total de 360 (84%) foram sexados com sucesso pela técnica de PCR. A proporção dos sexos encontrada para os touros 2 e 3 em todos os tratamentos não teve diferença em relação a proporção esperada de 1:1 (tabela 6). Um desvio na proporção dos sexos dos embriões para machos foi observada para o touro 1, somente quando se utilizou o tratamento 1 (tabela 6). Além disso, quando foram considerados apenas os tratamentos do *Percoll*, independentemente do touro, nenhuma diferença foi verificada na proporção macho:fêmea quando comparada a frequência esperada 1:1. Em contraste, quando a proporção dos sexos foi comparada entre os tratamentos a porcentagem de embriões machos foi maior para o tratamento 1 em relação aos demais (Figura.2).

Tabela 6 – Proporção dos sexos em blastocisto de D7 utilizando espermatozoides de três diferentes touros (1, 2 e 3) em três diferentes tratamentos (T1, T2 e T3) após a FIV.

Touro 1			
Tratamento	Embriões sexados (n)	Proporção dos sexos Macho:fêmea (%)	*P
T1	80	49:31 (61:39)	0,04
T2	52	24:28 (46:54)	0,58
T3	48	21:27 (44:56)	0,39
Touro 2			
Tratamento	Embriões sexados (n)	Macho:fêmea (%)	
T1	30	12:18 (40:60)	0,27
T2	40	19:21 (48:52)	0,75
T3	54	22:32 (41:59)	0,17
Touro 3			
Tratamento	Embriões sexados (n)	Macho:fêmea (%)	
T1	12	6:6 (50:50)	0,99
T2	19	7:12 (37:63)	0,25
T3	25	13:12 (52:48)	0,84
Tratamento	Embriões sexados (n)	Macho:fêmea (%)	
T1	122	67:55 (55:45)	0,28
T2	111	50:61 (45:55)	0,30
T3	127	56:71 (44:56)	0,18

*Valor de P comparando o sexo com a frequência esperada de 1:1 pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

T1 – 700 g/20 min em tubos de centrífuga utilizando 2 mL de *Percoll* 45% e 2mL de *Percoll* 90%;

T2 – 700 g/20 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

T3 - 5000 g/5 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

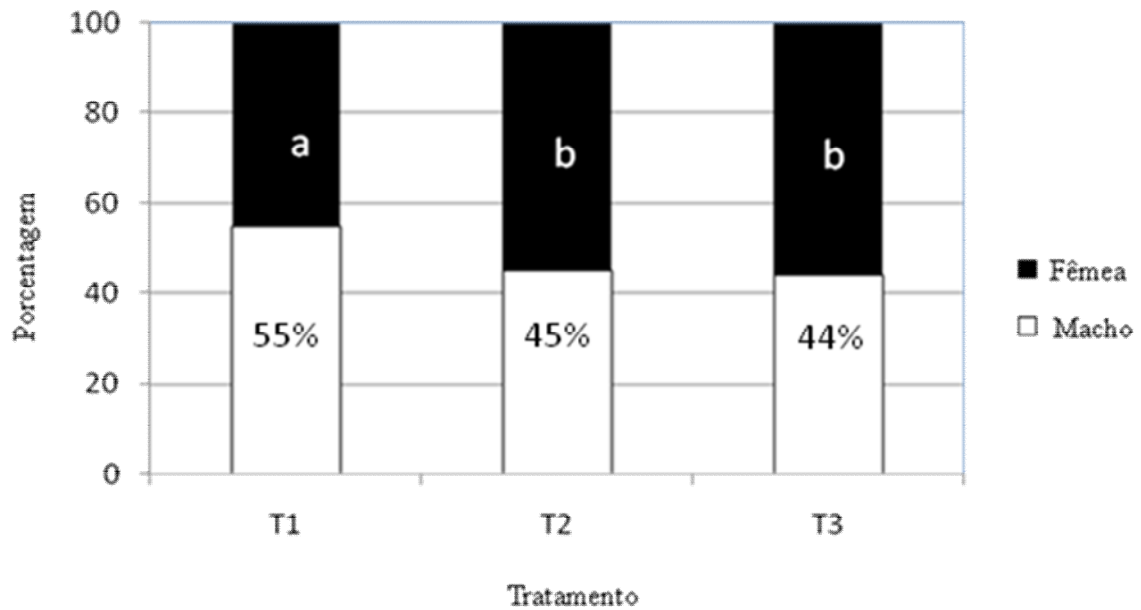


Figura 2- Distribuição de embriões PIV bovinos machos e fêmeas em D7 nos três tratamentos com o *Percoll*. ^{a,b} Diferentes letras denota diferença significativa entre os tratamentos pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

T1 – 700 g/20 min em tubos de centrífuga utilizando 2 mL de *Percoll* 45% e 2mL de *Percoll* 90%;

T2 – 700 g/20 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

T3 - 5000 g/5 min em microtubos utilizando 400 μ L de *Percoll* 45% e 400 μ L de *Percoll* 90%;

5.2. DISCUSSÃO

O gradiente de *Percoll* tem sido amplamente utilizado como método de seleção espermática para FIV em bovinos. Apesar de seu protocolo ter sofrido algumas mudanças ao longo dos anos, ultimamente com o uso do sêmen sexado na FIV comercial, modificações significativas têm sido propostas. Entretanto, não é prático para um laboratório ter protocolos diferentes para sêmen sexado e não sexado, por isso um método que possa ser utilizado com os dois tipos de sêmen seria de grande valia para a rotina da PIV. No presente estudo, foi comparado o efeito de diferentes protocolos de preparação de *Percoll* na qualidade espermática, desenvolvimento e sexo de embriões produzidos *in vitro*.

Muitos grupos de pesquisas têm relatado que o gradiente de *Percoll*, por proporcionar a obtenção de amostras de sêmen com melhor qualidade, é o método de eleição para selecionar espermatozóides para FIV em bovinos (Parrish et al., 1995; Somfai et al., 2002; Cesari et al., 2006; Mehmood et al., 2008). Todavia, a centrifugação também tem sido citada como sendo um passo do processo de preparação do sêmen, que é potencialmente danoso aos espermatozóides (Atiken & Clarkson, 1988). Portanto, para assegurar que a força de centrifugação e o volume de *Percoll* utilizados neste estudo não afetariam as características espermáticas, os parâmetros de qualidade foram avaliados antes e após os diferentes tratamentos de *Percoll*.

Como esperado a proporção de espermatozóides com motilidade total aumentou após a passagem pelo *Percoll* em todos os tratamentos, sendo o parâmetro que mostrou maior variação após a seleção espermática. O efeito do *Percoll* na seleção de espermatozóides com alta motilidade têm sido relatado por vários autores (Parrish et al., 1995,

Tanghe et al., 2002; Trentalance & Beorlegui, 2002; Cesari et al., 2006; ; Samardzija et al., 2006; Alomar et al., 2008) e esta característica não foi influenciada pelos diferentes procedimentos do *Percoll* utilizado neste estudo.

Embora o tempo reduzido de centrifugação utilizado no tratamento 3 pudesse causar redução na taxa de recuperação após a centrifugação do *Percoll*, nenhuma diferença entre os tratamentos foi observada. É possível que a alta força de rotação utilizada no tratamento três compensou o tempo de centrifugação, sendo que a taxa de recuperação foi semelhante entre os tratamentos.

Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos em todos os parâmetros avaliados. Estudos relatam que o aumento da força de rotação pode causar danos nas células espermáticas de carneiro (Gil et al., 2000), camundongo (Katkov & Mazur, 1998) e humano (Ng et al., 1990; Alvarez et al., 1993). Além disso, tem sido observado que a passagem pelo gradiente de *Percoll* pode alterar a membrana plasmática e causar reação acrossomal prematura (Cesari et al., 2006) devido a desestabilização da membrana. Esta alteração não foi observada no presente estudo, em que diferentes volumes, tempo e força de centrifugação não afetaram a qualidade das células espermáticas. Espermatozoides de espécies como equino e bovino são menos sensíveis a centrifugação quando comparados a outras espécies mamíferas (Crockett et al., 2001; Carvajal et al., 2004), portanto é possível que as modificações, realizadas neste trabalho, rotação de centrifugação e o baixo tempo, não tenham sido suficientes para causar danos nas células espermáticas.

Ao contrário dos resultados encontrados entre os tratamentos, o efeito de touro foi observado em todos os parâmetros avaliados. A alta variabilidade entre indivíduos era esperada, já que o sêmen dos touros utilizados na FIV não foi selecionado por terem a mesma qualidade. Os resultados mostraram uma diferença clara entre os touros em relação à qualidade seminal, e essas diferenças se mantiveram após a seleção do *Percoll*. Os touros 1 e 2 apresentaram resultados semelhantes para maioria das características espermáticas bem como os touros 3 e 4.

A produção de embriões também foi comparada entre todos os protocolos de preparação espermática. Semelhante aos parâmetros espermáticos, as taxas de clivagem e blastocisto também não foram afetadas pelo tratamento. Diferenças na produção de embrião foram observadas quando o efeito de touro foi considerado. Os touros 1 e 2 mostraram alta taxa de clivagem e blastocisto quando comparado com o touro 3. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados na avaliação das células espermáticas, já que os touros 1 e 2 também apresentaram porcentagem de motilidade, células normais e células com membrana, acrossoma e cromatina intactos semelhantes. Além disso, o touro 3 foi considerado como tendo menor fertilidade em comparação aos outros dois, se considerando a baixa qualidade espermática e o baixo desenvolvimento embrionário. O que é intrigante é que o touro 4, apesar de ter apresentado todas as características espermáticas semelhantes ao touro 3, apresentou baixo rendimento no desenvolvimento embrionário e teve que ser descartado da análise estatística.

A variação individual entre touro no resultado da FIV de embriões bovinos tem sido relatada por vários autores (Shamsuddin et al., 1993; Coelho et al., 2000; Palma & Sinowatz, 2004; Samardzija et al., 2006; Alomar et al., 2008) e, tem sido considerada como um dos fatores limitante na FIV comercial. Um dos motivos para essa ampla variação na taxa de blastocisto em bovinos pode ser a sensibilidade dos espermatozoides de cada touro aos procedimentos da FIV (Alomar et al., 2006). Muitos estudos têm observado que a seleção espermática antes da inseminação *in vitro* pode alterar características dos espermatozoides de tal forma que vários touros que apresentam alta fertilidade *in vivo* possuem baixa taxa de fertilidade *in vitro* (Shamsuddin & Larsson, 1993; Alomar et al., 2008). Entretanto, os fatores e mecanismos responsáveis por esses eventos ainda não estão claros. Os resultados do presente estudo, contudo, confirmam que touros com mesmas características espermáticas possuem diferentes capacidades de produzir embriões *in vitro*. Uma possível explicação poderia ser que os espermatozoides de determinados animais são mais sensíveis à passagem pelo gradiente de *Percoll* e isto poderia induzir, como já foi mencionado, a capacitação e reação acrossômica prematura (Chamberland et al., 2001), interferindo negativamente na produção de embriões. Todavia, essa alteração não foi observada no presente estudo, pois não foi detectada nenhuma diferença na integridade de membrana e acrossoma entre os touros. Pode-se observar que às características espermáticas do touro 4 foram semelhantes as dos outros touros, mas a produção de embrião foi pior. Portanto, pode-se supor que apesar da

análise visual da normalidade estrutural das células espermáticas possa ser um indicativo de qualidade, em alguns caso essas informações podem ser insuficientes para distinguir amostra com diferente fertilidade *in vitro*. Muitos outros fatores, como anormalidades no genoma paterno, podem influenciar não somente na fecundação, mas também no desenvolvimento embrionário. Além disso, é possível que a composição bioquímica da membrana plasmática e o estoque de RNAs que os espermatozóides levam para o ovócito, possam ser responsáveis pela variabilidade entre touros (Lalancette et al., 2008).

A centrifugação no gradiente de densidade de *Percoll* pode ser utilizada para separar células espermáticas que carregam o cromossomo X ou Y (Kaneko et al., 1983; Kaneko et al., 1984; Hossepian de Lima et al., 2000). Também tem sido relatado que mudanças no volume do *Percoll* bem como no tempo de centrifugação, podem favorecer o espermatozóide mais leve ou mais pesado alterando a relação de espermatozóide X e Y (Hossepian de Lima et al., 2000). Portanto, um possível impacto das mudanças no protocolo do *Percoll* na relação dos sexos de embriões tem que ser considerado. Os resultados deste estudo mostraram que para a maioria dos touros utilizados a taxa macho:fêmea não diferiu da frequência esperada de 1:1 em todos os tratamentos do *Percoll*. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram o gradiente *Percoll* para selecionar espermatozóides para FIV, e que também não encontraram desvio na relação dos sexos dos embriões quanto comparados à frequência esperada (Rheingantz et al., 2006; Madrid-Bury et al., 2003; Rheingantz et al., 2004). Porém, uma maior produção de embriões machos foi observada para touro 1 quando os espermatozóides passam por um maior volume de *Percoll*. Quando o volume final de *Percoll* foi reduzido para 800 μ L, independente do tempo e força de centrifugação, para este touro foi observado um equilíbrio entre os sexos. O porquê esse evento ocorreu somente em um touro e não nos demais ainda precisa ser elucidado, mas é possível que esteja relacionado com a variação individual.

Uma explicação para essa alta proporção de embriões machos no touro 1 seria que os espermatozóides portadores do cromossomo Y, que são mais leves do que os do X, levariam mais tempo para atravessar o maior volume do gradiente de densidade de (T1), permanecendo, portanto, mais tempo em contato com o *Percoll*. Um período mais longo de contato físico com o *Percoll* poderia induzir algumas alterações nas células espermáticas, que

quando colocadas no meio de FIV, poderiam ser hiperativadas e capacitadas mais rapidamente e, conseqüentemente, fecundariam os ovócitos antes que os espermatozóides com o cromossomo X. No tratamento com menor volume de *Percoll* nem os espermatozóides que carregam o cromossomo X nem os com Y levariam muito tempo para passar pela coluna e nenhum teria vantagem no momento da fecundação.

Quando a relação dos sexos dos embriões foi comparada entre os tratamentos, independente do touro utilizado foi observado que a proporção de embriões machos foi maior no tratamento 1 do que nos demais. Todavia, esta diferença ocorreu provavelmente devido ao efeito do touro já que ela foi observada somente no touro 1 e nenhuma diferença entre os tratamentos foi detectada para os outros touros.

6. CONCLUSÕES

Apesar do número pequeno de touros utilizados neste experimento, os resultados indicam que a diminuição do volume de *Percoll*, o decréscimo do tempo de centrifugação e uso da alta força de rotação não acarretou alteração da qualidade espermática, desenvolvimento embrionário e o desvio na proporção de embriões machos e fêmeas. Portanto, é possível aplicar o protocolo do *Percoll* proposto na rotina da FIV, pois esse reduz os custos e o tempo de manipulação.

7. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. Nós agradecemos a CAPES pelo apoio financeiro da aluna de pós-graduação. E gostaríamos de agradecer ao Dr. Carlos Frederico Martins (Embrapa – Cerrados, Planaltina, DF, Brasil) pela ajuda com a avaliação espermática utilizando o laranja de acridine.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.395-402, 2006.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal of Reproduction and Science**, v107, p.48-61, 2008.
- ALVAREZ, J.G.; LASSO, J.L.; BLASCO, L.; NUNEZ, R.C.; HEYNER, S.; CABALLERO, P.; STOREY, B.T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by dextran swim up procedure without centrifugation extends their motile life. **Human Reproduction**, v.8, p.1087-1092, 1993.
- ATIKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.9, p.367-376, 1988.
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Preparation of semen for morphological examination. In: BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**, Ames, Iowa: Iowa State University, 1989, p.8-18.
- BONDIOLLI, K.W.; ELLIS, S.B.; PRYOR, J.H.; et al. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 41, p.95-104, 1989.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**, v.25, p.389-396, 2004.

- CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 66, p.1185-1193, 2006.
- CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S.; SIRARD, M.A.; SULLIVAN, R.; BAILEY, J.L. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 55, p.823-835, 2001.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; ALMEIDA, J.R.I.L. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, No.2, p.397-402, 2000.
- CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v. 55, p.793-803.2001.
- DELL' AQUA, JR.A.; PAPA, F.O.; ARAÚJO, JR.J.P.; FREITAS, C.P.; PONCHIROLI, C.B.; FIGUEIREDO, A.S.; MELO, C.M.; ALBERTI, K.; CRESPILO, A.M.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ORLANDI, C.. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.205-212, 2006.
- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction and Science**, v 69, p.15-23, 2002.
- ELLIS, S.B.; BONDIOLLI, K.W.; WILLIAMS, M.E. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.29, p.242, 1988.
- GIL, J.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of RAM semen. **Theriogenology**, v. 54, p.93-108, 2000.
- HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352, 1990.
- HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v.1, p.108, 2003.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B.; MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y- bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v.53, p.480, 2000.
- KANEKO, S.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertility and Sterility**, v.40, p.661-665,1983.

- KANEKO, S.; OSHIO, S.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R.; MOHRI, H. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochemistry, Biophysics and Research Community*, v.124, p.950-955, 1984.
- KATKOV, I.I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.19, p.232-241, 1998.
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction of Domestic Animal*, v. 42, p.63-67, 2007.
- LALANCETTE, C.; THIBAUT, C.; BACHAND, I.; CARON, N.; BISSONNETTE, N.; Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. ***Biology of Reproduction***, v.78, p.618-635, 2008.
- MADRID-BURY, N.; FERNANDEZ, R. JIMENEZ, A. PEREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. ***Zygote***, v. 11, p.229-235, 2003.
- MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; SAQLAN NAQVI, S.M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sper separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. ***Animal of. Reproduction and Science***, 2008, in press.
- NG, S.C.; BONGSO, T.A.; SATHANANTHAN, H.; TOK, V.C.N.; RATNAM, S.S. Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on the fertilization of hamster oocyte after micro-insemination spermatozoa transfer. ***Human Reproduction***, v.5, p.209-211, 1990.
- PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. ***Anatomy, Histology and Embryology***, v.33, p.257-262, 2004.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMULLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. ***Anatomy, Histology and Embryology***, v.37, p.67-73, 2008.
- PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of X- and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animal*, v.39, p.58-60, 2004.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. ***Theriogenology***, v.44, p.859-869.1995.
- PRAKASH, P.; LEYKIN, L.; CHEN, Z.; TOTH, T.; SAYEGH, R.; SCHIFF, I.; ISAACSON, K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertility and Sterility*, v.69, p.722-726, 1998.

PROPHET 5.0; BBN SYSTEMS AND TECHNOLOGIES, 1997

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, A.O.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozóides selecionados por swim up ou gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v 41, p.32-39, 2004.

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. The sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation. *Animal of Reproduction*, v.3, p.423-430, 2006.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRIC, J.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal of Reproduction and Science*, v. 91, p.237-247, 2006.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction of Domestic Animal**, v.28, p.77-84, 1993.

SOMFAI, T.; BODO, S.; NAGY, S.; PAPP, A.B.; IVANCSICS, J.; BARANYAI, B.; GOCZA, E.; KOVACS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animal*, v.37, p.285-290, 2002.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 37, p.127-132, 2002.

TRENTALANCE, G.M.; BEORLEGUI, N.B. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. **Andrology**, v. 34, p.397-403, 2002.

WILSON, R.D.; FRICKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J.J.; SYVERSON PENFIELD, C.M.; WEIGEL, K.A. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, p.1007-1015, 2006.

WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Comparasion of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 43, p.1301-1316, 1995.