



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZÓIDE BOVINO CRIOPRESERVADO
APÓS SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES**

JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO NETO

DISERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZÓIDE BOVINO CRIOPRESERVADO
APÓS SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES**

José de Oliveira Carvalho Neto

Orientador: Roberto Sartori Filho

Co-orientador (a): Margot Alves Nunes Dode

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

014/2009

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CARVALHO, J.O. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 91p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra 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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CARVALHO, José de Oliveira. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 91p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Sexagem espermática.
2. Sexo dos embriões.
3. Desenvolvimento embrionário.
4. Fecundação.

CDD ou CDU
Agris/FAO

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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZÓIDE BOVINO CRIOPRESERVADO
APÓS SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES**

JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO NETO

**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:

**ROBERTO SARTORI FILHO, PhD (ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA
“LUIZ DE QUEIROZ” – ESALQ, USP)
(ORIENTADOR)**

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dr.(a) (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**SONY DIMAS BICUDO, Dr. (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO – FMVZ, UNESP)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 28 de MAIO de 2009

À minha família, especialmente aos meus pais, Joaquim e Ana, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito da dedicação constante no presente. Dedico a vocês minha conquista, com a mais profunda admiração, respeito e carinho.

“Cada um de nós teve na juventude uma figura especial que, com paciência, afeto e sabedoria, nos ajudou a escolher caminhos e olhar o mundo por uma perspectiva diferente”

Mitch Albom

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai por despertar em mim esta paixão. A minha mãe, que sempre me guiou sabiamente. As minhas irmãs que sempre me incentivaram.

Aos meus avós que se alegram com cada vitória.

Aos meus padrinhos, que há muito são considerados como pais.

À co-orientadora, Margot Alves Nunes Dode, por tanto se dedicar a mim em seus ensinamentos, orientação, paciência e estímulo.

Ao orientador Roberto Sartori Filho, pela oportunidade concedida, me acolhendo sinceramente desde o princípio e orientando nos momentos necessários.

Às amigas Grazieli Marinheiro Machado, Juliana Azevedo e Amanda Lemes pelo auxílio durante o desenvolvimento experimental.

À amiga Ligiane Leme, que me ensinou, cuidadosa e pacientemente, parte do que precisei para realização deste trabalho.

Ao Prof. Gerson Barreto Mourão pela orientação e execução da análise estatística.

Aos pesquisadores Maurício Machaim Franco, Eduardo Mello e Rodolfo Rumpf e ao técnico Regivaldo Vieira de Souza, pesquisadores de grande capacidade com os quais tive o privilégio de conviver durante este período.

Aos amigos pós-graduandos e graduandos Allice Ferreira, Ana Cláudia Valeriano, Clarice Laender, Edylaine Castro, Emivaldo Siqueira filho, Ester Caixeta, Fernanda Paulini, Flávia Tuany, Heitor Teixeira, Jefferson Badaraco, Katlen Driesen, Marcelo Moura, Maria Clara Mattos, Michele Bastos, Monique Guardieiro, Nádia Fagundes, Tatiana Campos, Tatiane Mundin, Tiago Diesel e Valquíria Lacerda, cujo convívio proporcionou momentos de alegria, mas também de aprendizado para o crescimento pessoal e profissional.

À EMBRAPA recursos genéticos e biotecnologia, pelo suporte para que este experimento pudesse ser realizado.

Aos funcionários da EMBRAPA pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

À Universidade de Brasília pelo curso oferecido.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram juntos durante este período, e que não tiveram os nomes citados nestas linhas. Tenham certeza que lhes sou muito grato.

ÍNDICE

Capítulos	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	01
1.2 OBJETIVO	04
1.3 HIPÓTESE	05
2 REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FUNCIONAIS DA CÉLULA ESPERMÁTICA	06
2.1.1 CABEÇA	07
2.1.2 CAUDA	08
2.1.3 MEMBRANAS ESPERMÁTICAS	09
2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA FECUNDAÇÃO	10
2.3 AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO ESPERMATOZÓIDE	13
2.3.1 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	14
2.3.2 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E CAPACITAÇÃO	16
2.3.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CROMATINA	20
2.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA CÉLULA ESPERMÁTICA	22
2.4.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	22
2.5 IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM MAMÍFEROS	25
2.6 SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES CONTENDO CROMOSSOMO X OU Y	26
2.6.1 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPECÍFICAS DO ESPERMATOZÓIDE CONTENDO CROMOSSOMO X OU Y	26
2.6.2 DIFERENÇA NO CONTEÚDO DE DNA	27
2.6.2.1 SEXAGEM POR GRADIENTE DE SEDIMENTAÇÃO OU CENTRIFUGAÇÃO	28
2.6.2.2 SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	29
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 2	46
1 RESUMO	47
2 ABSTRACT	49
3 INTRODUÇÃO	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 REAGENTE	53
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS	54

4.3.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ESPERMÁTICA, MORFOLOGIA E TAXA DE RECUPERAÇÃO	54
4.3.2 AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO, INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA DO ACROSSOMA E DA CROMATINA	55
4.4 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	58
4.4.1 RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	58
4.4.2 SELEÇÃO ESPERMÁTICA	59
4.4.3 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CULTIVO DE EMBRIÕES	60
4.5 AVALIAÇÃO DA TAXA DE FECUNDAÇÃO E DO ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	60
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	62
5.1 RESULTADOS	62
5.2 DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espermatozóide corado com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (padrão capacitado), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 100x. 56
- Figura 2. Espermatozóides corados com diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), demonstrando membrana plasmática íntegra (A), membrana plasmática lesada (B) e membrana plasmática semi lesada (C), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40x. 56
- Figura 3. Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (A) visualizado no contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de isotocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozóide morto com acrossoma reagido (B) visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 40x. 57
- Figura 4. Espermatozóide corado com alaranjado de acridine, demonstrando espermatozóide com cromatina íntegra (A) e cromatina lesada (B), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40 x. 58
- Figura 5. Proporção (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva, morfológicamente normais, com cabeça aglutinada e com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegras, antes e após passagem pelo gradiente de *Percoll* de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). ^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna de cada grupo, diferem ($p < 0,05$). 65
- Figura 6. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA antes e após passagem pelo gradiente de *Percoll* de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). ^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna de cada grupo, diferem significativamente ($p < 0,05$). 67
- Figura 7. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de ovócitos fecundados 18 horas pi utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY), não sendo encontrada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos (ovócitos fecundados/ovócitos inseminados). 69

- Figura 8 Distribuição (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cromatina masculina em zigotos 18 horas pi, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY), não sendo encontrada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos para qualquer estágio da cromatina masculina. 68
- Figura 9. Distribuição (média dos quadrados mínimos \pm EP) do estágio de desenvolvimento embrionário utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). Sendo: 5) Blastocisto inicial; 6) Blastocisto; 7) Blastocisto expandido; 8) Blastocisto eclodido. 70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva, morfologicamente normais, com cabeça aglutinada, com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegros, de sêmen não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) antes da passagem pelo gradiente de *Percoll*. 63
- Tabela 2. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva, morfologicamente normais, com cabeça aglutinada, capacitados, com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegros, de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) após passagem pelo gradiente de *Percoll*. 63
- Tabela 3. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA para de sêmen não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) antes da passagem pelo gradiente de *Percoll*. 66
- Tabela 4. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) após passagem pelo gradiente de *Percoll*. 66
- Tabela 5. Taxa de clivagem e produção de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo em relação número total de ovócitos (média dos quadrados mínimos \pm EP), pós fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X(SX) e Y(SY). 69
- Tabela 6. Taxa de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo em relação ao número de ovócitos clivados (média dos quadrados mínimos \pm EP), pós fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X(SX) e Y(SY). 69
- Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre diferentes variáveis espermáticas após passagem pelo gradiente de *Percoll* e taxa de produção de blastocisto em D8 71

RESUMO

AValiação DA QUALIDADE DO ESPERMATOZÓIDE BOVINO CRIOPRESERVADO APÓS SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

José de Oliveira Carvalho¹, Roberto Sartori²

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, SP

Estudos utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo têm demonstrado uma menor fertilidade deste quando comparado ao não sexado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade estrutural e funcional da célula espermática após sexagem por citometria de fluxo. Amostras de sêmen congelado de quatro touros foram utilizadas. Um ejaculado de cada touro foi coletado e fracionado em três partes, sendo: não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). Uma palheta de sêmen foi descongelada sendo uma amostra retirada para avaliação da cinética espermática por sistema computadorizado (CASA – computer-assisted semen analysis), aglutinação de cabeça, alterações morfológicas, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, capacitação espermática e integridade da cromatina. O restante foi depositado em gradiente de *Percoll* de 90:45% (NS90) ou 60:45% (NS60, SX e SY). Após centrifugação em gradiente de *Percoll*, o *pellet* resultante foi homogeneizado, sendo utilizado para avaliação espermática ou PIV. Cada procedimento foi repetido três vezes em manipulações diferentes. Para PIV, 2271 ovócitos maturados *in vitro* foram utilizados, sendo avaliada taxa de fecundação por coloração lacmóide 18 horas pi, clivagem avaliada em D2 (48 hpi) e a taxa de produção de blastocisto avaliada em D6, D7, D8 e D9 de cultivo. Os dados foram analisados usando procedimento GLIMMIX do programa SAS^(R) ($p < 0,05$). Nas características espermáticas avaliadas antes ou após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos SX e SY para todas as variáveis estudadas. As avaliações realizadas antes e após a passagem pelo gradiente de *Percoll* mostraram que o sêmen não sexado apresentou maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana íntegra e células vivas com acrossoma intacto do que o sêmen sexado. Foi observado um efeito do gradiente de *Percoll*

nas amostras de sêmen não sexado, sendo que aquelas submetidas ao gradiente de 90:45% apresentaram maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana intacta e menor taxa de recuperação do que as submetidas ao gradiente de 60:45%. Para taxa de fecundação não foi encontrada diferença entre os grupos. O grupo NS90 apresentou maior taxa de clivagem do que o grupo SY, enquanto que os grupos NS60 e SX foram semelhantes aos demais. A taxa de produção de blastocisto dos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo foi maior no grupo NS90 do que no NS60, SX e SY. Com relação à cinética de desenvolvimento embrionário, não foi observado diferença entre os grupos no estágio do embrião nos dias 6, 7, 8 e 9 pi. Os resultados indicam que o processo de sexagem afeta as características espermáticas, mas não causa diminuição da fertilidade *in vitro*. No entanto, a diferença nas taxas de blastocisto entre os grupos NS60 e NS90 indica que há um efeito do protocolo de seleção espermática na produção de embriões.

Palavra chave: Desenvolvimento embrionário, fecundação, sexo dos embriões, FIV

ABSTRACT**QUALITY ASSESSMENT OF BOVINE SPERM CRYOPRESERVED AFTER SEX SORTING BY FLOW CYTOMETRY AND ITS USE ON IN VITRO EMBRYO PRODUCTION**José de Oliveira Carvalho¹, Roberto Sartori²¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ²College of Agriculture “Luiz de Queiroz” – ESALQ, SP

Several studies using sex-sorted sperm by flow cytometry have shown that sexed sperm has lower fertility than the non-sexed. Therefore, the objective of the present study was to evaluate structural and functional characteristics of sperm sexed by flow cytometry. In addition, in vitro embryo production and development was assessed when sexed and non-sexed sperm were used for in vitro fertilization. Frozen sexed and non-sexed semen from four sires were used. One ejaculate from each bull was obtained and separated into three portions, being non-sexed (NS), sexed for X (SX) and sexed for Y (SY). Frozen-thawed semen from each sample was analyzed for motility by computer-assisted semen analysis (CASA), sperm head agglutination, sperm morphology, plasma membrane integrity, acrosome integrity, capacitation and chromatin integrity. Then, the samples were placed in 90:45% (NS90) or 60:45% (NS60, SX e SY) *Percoll* gradient. After *Percoll* centrifugation, the *pellet* was used for sperm analysis or IVF. All sperm quality tests and IVF experiments were repeated three times in independent replicates. For IVF a total of 2271 in vitro matured oocytes were used. To assess fertilization rate presumptive zygotes were fixed and stained with lacmoid at 18 hpi. Cleavage was evaluated at D2 (48 hpi) and blastocyst at D6, D7, D8 and D9 of culture. Data were analyzed using proc GLIMMIX of SAS^(R) ($p < 0.05$). No differences were observed between SX and SY groups for any of the sperm variables evaluated either before or after *Percoll* centrifugation. The evaluations performed before and after *Percoll* treatment showed that non-sexed sperm had higher motility, higher percentage of cells with intact membrane and higher percentage of live cells with intact acrosome than sexed sperm. An effect of *Percoll* gradient was observed in the non-sexed samples, with those submitted to 90:45% gradient presenting higher motility, higher percentage of cells with intact membrane and lower recovery rate than those submitted to a 60:45% gradient. No differences among groups were observed for fertilization rate. NS90 group showed higher cleavage rate than the SY

group, while groups NS60 and SX had similar rates to the others. Blastocyst rates at D6, D7, D8 and D9 of culture was greater for group NS90, and similar among NS60, SX and SY groups. Regarding embryo development kinetics, all groups showed similar developmental stages on D6, D7, D8 and D9. The results suggest that although the sex-sorting procedure by flow cytometry affected sperm characteristics, it did not cause a decrease on in vitro fertility. In addition, differences in blastocyst rates between groups NS60 and NS90 indicated an effect of sperm selection protocol on embryo production.

Key-words: Kinetics of development, Fertilization, sex of embryo, IVF

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A escolha do sexo dos descendentes tem sido almejada desde a época da Grécia antiga em que o sexo masculino, por sua importância social e cultural, era o mais desejado. Os gregos acreditavam que os espermatozóides do testículo esquerdo originavam os indivíduos do sexo feminino e, preconizavam sua retirada como método para gerar apenas indivíduos do sexo masculino. Posteriormente, Aristóteles propôs que o sexo era determinado pelo calor do parceiro masculino e que as fêmeas seriam machos cujo desenvolvimento foi interrompido precocemente quando o frio do útero superava o calor do sêmen paterno. Já no final do século XIX a determinação do sexo era atribuída apenas ao cromossomo X, sendo o macho X0 e a fêmea XX. Foi somente no início do século XX que Bridges em 1914 descobriu que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X com outro morfológicamente distinto, denominando-o Y (citado por Pergorato & Hossepian de Lima, 2001).

Com base nesse conhecimento e em estudos mais aprofundados desses dois cromossomos assim como dos gametas, é que teve início uma busca mais embasada por técnicas que pudessem pré determinar o sexo. Sendo que esses estudos tiveram como alvo o gameta masculino, considerando que esse era o responsável pela determinação do sexo do embrião.

Várias técnicas foram desenvolvidas na tentativa de separar os espermatozóides carreadores do cromossoma X e do Y. Essas técnicas foram baseadas em características dos espermatozóides tais como: sensibilidade ao pH (Emmens, 1960), carga elétrica da superfície da membrana (Gordon, 1957; Kaneko et al., 1984), morfologia do núcleo e cabeça (Shettles, 1960), antígenos de superfície (Koo et al., 1973) e diferença no conteúdo de DNA (Johnson et al., 1987; 1989).

Em animais domésticos, a partir da década de 80, com o incremento do uso da inseminação artificial (IA) e com início da utilização da transferência de embriões (TE) nos programas de melhoramento genético, o interesse por técnicas de sexagem começou a ser mais intenso.

Então, Johnson et al. (1987), baseado na diferença de DNA entre os cromossoma X e Y, desenvolveu um procedimento de separação de espermatozóide utilizando a citometria de fluxo. Dentre as diversas técnicas já citadas, esta tecnologia é a única provada cientificamente que, com segurança, pode separar espermatozóides X ou Y com aproximadamente 90% de pureza. Esse procedimento, portanto, tornou a escolha do sexo dos descendentes uma realidade na produção animal.

A seleção do sexo tem um valor econômico significativo na pecuária de leite ou corte, em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos. Desta forma, a utilização do sêmen sexado contribui para o aumento da rentabilidade na produção (Seidel Jr, 2008), por possibilitar a produção de descendentes com o sexo desejado, visando à vantagem de se produzir machos e fêmeas para mercados específicos. Além disso, sua aplicação em testes de progênie pode reduzir os custos inerentes a este programa, devido ao direcionamento do sexo dos animais nascidos, diminuindo o número convencional de inseminações hoje utilizadas.

Atualmente o emprego do sêmen sexado na reprodução de bovinos já é uma realidade, o que pode ser constatado pelo aumento na produção de mais de 4 milhões de palhetas de sêmen em 2008, superando os 2 milhões produzidas em 2007 (Sharpe & Evans, 2009). Entretanto, a sua utilização está restrita à apenas alguns setores de produção devido a algumas limitações do sêmen sexado. A quantidade de doses produzidas é reduzida, colaborando para o aumento do custo de produção e conseqüentemente alto valor de comercialização. Além disso, variações nas taxas de fertilidade também limitam a sua utilização dentro do sistema de produção. Portanto, apesar da técnica de sexagem por citometria de fluxo ser a mais eficiente até o momento, mais informações são necessárias para a melhoria do processo de sexagem, de forma que essas limitações possam ser sanadas e seu uso de acesso à todos os segmentos da produção animal.

A viabilidade do sêmen sexado foi verificada em diversos estudos, sendo demonstrado que as taxas de gestação ou de produção de embriões são inferiores quando comparadas às obtidas com sêmen não sexado (Seidel Jr et al., 1999; Sartori et al., 2004; Bodmer et al., 2005; Schenk et al., 2005; Andersson et al., 2006). Esses resultados sugerem que esta técnica pode gerar alguns danos aos espermatozóides, provavelmente devido à

exposição ao *laser*, grande pressão na passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e/ou permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes de ser processado (Chastant-Maillard & Druat, 2005).

Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acuidade de sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozoides após a descongelação das doses de sêmen, já que os possíveis danos sofridos pela célula espermática durante o processo de sexagem podem ser responsáveis pela diminuição nos índices de prenhez. No processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões, apesar de menores índices de produção de blastocistos serem observados quando espermatozoides sexados são utilizados, essa ainda é a técnica mais viável para gerar descendentes com o sexo pré-determinado em bovinos (Faber et al., 2003). Isso porque na PIV é possível utilizar um menor número de espermatozoides para fecundar um grande número de ovócitos, otimizando o uso de uma dose de sêmen sexado que além de apresentar células menos viáveis também apresenta menor concentração de células/dose. Portanto, a tendência é que ocorra cada vez mais um aumento do uso do sêmen sexado na PIV comercial, tendo em vista as inúmeras vantagens que esta técnicas traz para o mercado de embriões bovinos.

Desta forma, mais estudos são necessários para verificação de possíveis alterações causadas na célula espermática durante o processo de sexagem (Dell'Aqua Jr. et al., 2006). Esse conhecimento permitirá estabelecer procedimentos mais adequados para melhorar o aproveitamento e os resultados quando da utilização deste sêmen na produção de embriões.

1.2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade estrutural e funcional da célula espermática criopreservada após sexagem por citometria de fluxo. Além disso, visou comparar a cinética de desenvolvimento de embriões machos e fêmeas produzidos *in vitro*.

1.3 HIPÓTESE

O processo de sexagem por citometria de fluxo afeta a qualidade estrutural e funcional da célula espermática criopreservada. E, quando produzidos *in vitro*, embriões fêmeas apresentam desenvolvimento mais lento que embriões machos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Morfológicos e Funcionais da Célula Espermática

O gameta masculino é produzido nos túbulos seminíferos dos testículos por um longo processo chamado espermatogênese (Cheng et al., 2004). Tal processo envolve várias divisões e transformações das células germinativas primordiais dando origem aos espermatozóides e pode ser dividido em espermatocitogênese e espermiogênese (Garner & Hafez, 2004).

Na espermatocitogênese, as espermatogônias, originam os espermatócitos primários ($n = 4$), que entram em meiose sofrendo duas divisões consecutivas resultando em espermatócito secundário e espermátide, respectivamente, formando a célula haplóide (Barth & Oko, 1989).

Na espermiogênese, ocorre a remodelação das espermátides, que se diferenciam de células arredondadas em células germinativas maduras, na forma de espermatozóides (Johnson et al., 2000). Essa diferenciação envolve as fases de Golgi, Capuchão, Acrossoma e Maturação. A fase de Golgi é iniciada pela formação de grânulos proacrossomáticos. Estes grânulos se fundem, formando um único compartimento que se adere ao envelope nuclear, dando início à fase do Capuchão. Esta última é caracterizada pela migração e aderência dos grânulos ao redor do núcleo da espermátide (Setchell, 1993) até que aproximadamente dois terços da porção anterior do mesmo sejam recobertos por um fino envoltório de dupla camada, denominado acrossoma, que se adere intimamente ao envelope nuclear (Garner & Hafez, 2004). Na próxima fase, conhecida como fase do Acrossoma, ocorrem maiores modificações no núcleo, acrossoma e cauda das espermátides. As

modificações incluem condensação da cromatina, prolongação do acrossoma e organização das mitocôndrias. A última fase, denominada Maturação envolve a transformação final das espermatídes alongadas em células que serão liberadas para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, em um processo chamado espermição (Garner & Hafez, 2004). Nesse processo, uma grande fração do citoplasma é eliminada, quando o espermatozóide é liberado no lúmen dos túbulos seminíferos. O restante do citoplasma permanece ligado ao colo do espermatozóide formando a gota citoplasmática, que é posteriormente eliminada durante a passagem do espermatozóide pelo epidídimo (Setchell, 1993; Garner & Hafez, 2004).

Os espermatozóides mamíferos, quando liberados, possuem dois componentes principais, a cabeça e o flagelo ou cauda, unidos pelo colo, sendo toda a célula coberta pela membrana plasmática (MP) (Mortimer, 1997).

2.1.1 Cabeça

O formato da cabeça e as dimensões do espermatozóide variam segundo a espécie. Nos bovinos, a cabeça possui forma arredondada e achatada, assim como em outras espécies domésticas. A cabeça espermática consiste, em sua maior parte, de um núcleo envolvido pelo envelope nuclear, e formado por uma massa condensada de DNA, a cromatina (Johnson, 1994). Esta é sustentada inicialmente por histonas, ricas em lisina, que são substituídas pelas protaminas, ricas em cisteína (Setchell, 1993), o que ocorre principalmente na fase do acrossoma e maturação, durante a espermatogênese.

Os resíduos de cisteína sofrem oxidação do grupo tiol, formando grande número de ligações dissulfeto, reação que ocorre especificamente durante a maturação do espermatozóide no epidídimo. As protaminas se tornam altamente alfa-helicoisadas e se ligam ao DNA, possibilitando as duplas hélices se compactarem, conferindo estabilidade ao núcleo do espermatozóide, para que o complexo desoxirribonuclear-protéico (DNP) seja resistente à desnaturação. Portanto, a cromatina espermática resulta na associação entre o DNA e as protaminas (Unanian, 2000).

Recoberto até dois terços da porção anterior da cabeça, entre o lado interno da MP e o núcleo, há o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas tais como a hialuronidase e acrosina (Johnson, 1994). Esta estrutura é de grande importância, pois é responsável por

todas as reações iniciais necessárias ao processo de fecundação (Barth & Oko, 1989) pois auxilia a penetração do espermatozóide no ovócito.

O acrossoma se dispõe sobre o núcleo na porção anterior da cabeça do espermatozóide, sendo contido pela membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear, enquanto a membrana acrossomal externa está em contato com o lado interno da membrana plasmática. Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a MP se fundem e formam vesículas, liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozóide com o ovócito (Flesch & Gadella, 2000), sendo o segmento equatorial, a porção que se funde inicialmente com a membrana do ovócito durante a fecundação (Garner & Hafez, 2004).

Na região pós-acrossomal encontra-se a parte posterior do núcleo e microtúbulos onde é formada a fossa de implantação ou colo em que a cauda é inserida (Barth & Oko, 1989).

2.1.2 Cauda

A cauda ou flagelo do espermatozóide mamífero varia entre as espécies em relação ao tamanho e forma, mas a estrutura geral é similar. A cauda do espermatozóide é constituída por colo, peça intermediária, principal e terminal. No centro da cauda encontra-se o axonema, composto por nove microtúbulos localizados na periferia do cilindro e por dois microtúbulos simples centrais (Garner & Hafez, 2004). Entretanto, à medida em 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). Na peça intermediária, recobrimo todas estas estruturas, encontra-se uma espiral de mitocôndrias (Manella, 2000).

O colo, próximo à peça intermediária, é a porção da cauda que se liga à cabeça do espermatozóide. A extremidade proximal, consiste numa região articulada chamada de *capitulum*, a qual é fixada à membrana basal do núcleo por uma série de delicados filamentos (Setchell, 1993).

A peça intermediária estende-se do ponto de união da cauda com a cabeça espermática (colo) até o final da hélice mitocondrial. A principal função fisiológica das

mitocôndrias, presentes nesta região da cauda, é disponibilizar energia através da produção de ATP via fosforilação oxidativa (Manella, 2000).

Na peça principal, desaparece a hélice mitocondrial, mas há continuidade dos filamentos do axonema, recoberto por uma bainha fibrosa fenestrada (Setchell, 1993). A bainha fibrosa é uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar (Eddy & O'Brien, 1994; Mortimer, 1997).

2.1.3 Membranas espermáticas

As membranas (plasmática, nuclear e acrossomal) da célula espermática são agregados de lipídios e proteínas construídas durante a espermatogênese e modificadas durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação. A função das membranas é determinada pela interação de suas várias componentes; desse modo, algum evento que modifique estas interações, pode alterar sua função (Flesch & Gadella, 2000).

A MP exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fecundante (Celeghini, 2005), uma vez que é responsável pelo equilíbrio osmótico, pois atua como uma barreira seletiva entre os meios intra e extracelular. Proteínas específicas da MP facilitam o transporte de glicose e frutose do meio extracelular para o espermatozóide, sendo a glicose e frutose fontes indispensáveis de substrato energético (Celeghini, 2005; Silva & Gadella, 2006).

A MP é formada basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (Eddy & O'Brien, 1994). Desta forma, as membranas espermáticas apresentam-se em um estado líquido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são a sua composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana está exposta (Hammerstedt et al., 1990). A manutenção do estado líquido e das proteínas de membrana permitem a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações (Hammerstedt et al., 1990; Flesch & Gadella, 2000).

A MP é separada dentro de regiões específicas e domínios. Na cabeça do espermatozóide, a MP possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-

acrossomal. Na região acrossomal a MP pode ser sub-dividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, são denominados capa acrossomal. Na região pós acrossomal, a membrana plasmática é sustentada por uma densa camada chamada bainha pós-acrossomal ou lâmina densa pós-acrossomal. Na extremidade caudal, as membranas nucleares formam a fossa de implantação onde a cauda é inserida (Setchell, 1993).

A MP da cauda é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (Eddy & O'Brien, 1994).

A MP da cabeça do espermatozóide é separada da MP da peça intermediária pelo anel posterior, o qual é separado da MP do flagelo pelo anel anular. Estes domínios diferentes contêm concentrações e distribuições de partículas intra-membranosas variadas (Flesch & Gadella, 2000).

Esta diferenciação regional com seus domínios específicos, que compõe a superfície espermática, é relacionada com funções especializadas. Assim, moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes no acrossoma anterior, moléculas envolvidas na fusão do espermatozóide com o ovócito, estão presentes sobre o acrossoma posterior e moléculas envolvidas na atividade flagelar estão associadas à MP da cauda (Eddy & O'Brien, 1994).

Portanto, a integridade da MP exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fecundante (Graham et al., 1990).

2.2 Mecanismos Envolvidos na Fecundação

A fecundação é um processo complexo que depende da interação de um ovócito maduro e competente com um espermatozóide móvel, capacitado e capaz de sofrer a reação acrossômica (Molnarova et al., 2006). Somente o espermatozóide que passa corretamente pelo processo de capacitação e reação do acrossoma, sofrendo todas as alterações funcionais e estruturais, se torna apto a fecundar o ovócito (Gadella et al., 2001; Areekijserree & Veerapraditsin, 2007).

O processo de capacitação consiste na remoção ou alterações de substâncias que estabilizam a membrana plasmática do espermatozóide. Dentre os processos envolvidos, destacam-se modificações da fluidez e da morfologia da MP e alterações do fluxo de íons e do pH intracelular. Além disso, também ocorrem alterações das glicoproteínas periféricas, rearranjo das proteínas integrais, redução da quantidade de colesterol e mudanças na distribuição e composição dos fosfolipídeos que estão associados à reação acrossomal (Blondin et al., 2009).

Um importante componente relacionado à capacitação é o cálcio (Ca^{2+}). A incubação em meio contendo Ca^{2+} em níveis elevados acelera a transição de espermatozóides do estado não capacitado para o estado de capacitação (Marquez & Suarez, 2007).

Outro elemento envolvido no processo de capacitação é a albumina, que promove o efluxo de colesterol, iniciando a desestabilização da membrana do espermatozóide (Nimmo & Cross, 2002). Além da albumina, outro componente importante envolvido no processo de capacitação espermática é o bicarbonato de sódio (HCO_3^-). Acredita-se que o HCO_3^- induz à redistribuição lateral do colesterol da MP, facilitando a extração do lipídio pela albumina (Flesch et al., 2001). A eliminação do colesterol é uma das últimas etapas deste processo, e resulta na capacitação, hiperativação e reação acrossômica.

A hiperativação é um fenômeno cálcio-dependente, que altera o padrão de motilidade do espermatozóide. Este padrão hiperativado é determinado por uma maior amplitude de batimento flagelar, aumento da flexibilidade da região proximal da peça intermediária, tendo uma maior velocidade curvilínea e deslocamento lateral da cabeça, e menor linearidade (Mortimer, 1997). Uma possível função da hiperativação é que o padrão de batimento flagelar de um espermatozóide hiperativado ajuda na orientação do espermatozóide ao local de fecundação (Katz & Drobnis, 1990). Além disso, em parte, essa hiperativação auxilia na penetração do espermatozóide à zona pelúcida (ZP) do ovócito (Boatman & Magnoni, 1995), evento necessário à fecundação. No entanto, outro pré-requisito para fecundação, além da capacitação e hiperativação, é a reação acrossômica, fenômeno que ocorre após a capacitação e é induzida pela ligação do espermatozóides às glicoproteínas específicas da ZP.

A ZP é uma camada extracelular, constituída de glicoproteínas sulfatadas, de diferentes pesos moleculares e funções, denominadas ZP1, ZP2 e ZP3. Estas proteínas são sintetizadas pelo ovócito em crescimento e secretadas para formar estruturas de dímeros de ZP2 e ZP3, que possuem receptores secundários e primários, respectivamente, e são interligadas por ZP1 (Petersen et al., 2000).

Os espermatozoides capacitados se ligam aos receptores primários de ZP3, sendo esta ligação espécie-específica (Wassarman et al., 2001). A ligação com a ZP3 provoca uma cascata de eventos, culminando em um aumento intracelular de Ca^{2+} , pela liberação de reservas intracelulares e pela entrada de Ca^{2+} extracelular. O Ca^{2+} age em fosfolipídios da MP facilitando a fusão do espermatozoide e ovócito. Outro evento causado pelo aumento de Ca^{2+} é a abertura dos canais de sódio, permitindo a entrada de sódio e hidrogênio, levando a um aumento do pH intracelular (Gadella et al., 2001). Além da entrada de Ca^{2+} , o aumento do pH e produção de substâncias fusogênicas, ocorre ainda um influxo de água resultando em um aumento da pressão hidrostática, a qual auxilia o início da reação acrossômica (Yanagimachi, 1994).

A reação acrossômica consiste inicialmente na fusão entre a membrana externa do acrossoma e a porção da membrana plasmática que o envolve, resultando na formação de vesículas originárias de ambas as membranas, as quais liberam enzimas acrossomais. Em um estágio mais adiantado, as vesículas são eliminadas da superfície do espermatozoide, ocorrendo uma liberação mais intensa das enzimas acrossomais (Cardullo & Florman, 1993). Após a reação acrossomal, outro receptor no espermatozoide é exposto, e esse se liga a outra glicoproteína da membrana (ZP2) e com o auxílio das enzimas que foram liberadas e da hipermotilidade, o espermatozoide ultrapassa a ZP (Wassarman et al., 2001).

Após passar a ZP, a região equatorial do espermatozoide ainda permanece intacta. O espermatozoide então, já no espaço perivitelínico do ovócito, através da região equatorial, se liga à MP do ovócito e é incorporado ao citoplasma do mesmo (Areekijsee & Veerapraditsin, 2007). Se a reação do acrossoma é iniciada antes da ligação do espermatozoide à ZP, as enzimas são perdidas e o espermatozoide não é capaz de ultrapassar a ZP e de fecundar o ovócito (Gadella et al., 2001).

Imediatamente após a penetração espermática, as proteínas perinucleares que formam o envelope nuclear, são dissolvidas no citoplasma pela ação de fatores citoplasmáticos e das microvilosidades do ovócito (Sutovsky et al., 1997). Inicia-se a descondensação do material nuclear, que ocorre após a redução das pontes dissulfídicas das protaminas nucleares e substituição das protaminas por histonas (Yanagimachi, 1994). A cromatina nuclear descondensa, surge uma nova membrana nuclear formando uma estrutura denominada pró-núcleo masculino (Gonçalves et al., 2001).

Nos bovinos, o desenvolvimento do pró-núcleo masculino tem início 4 horas após a inseminação (fecundação *in vitro*), sendo a fase S (síntese de DNA), iniciada após 8 a 10 horas (Laurincik et al., 1998).

Concomitantemente, a penetração do espermatozóide no ovócito, também faz com que ocorra a ativação do ovócito, iniciando uma série de eventos morfológicos e bioquímicos. Acredita-se que a ativação leve a um aumento do pH intracelular. Outra mudança que pode ser notada após a ativação, é o aumento do cálcio intracelular e a diminuição do sódio, causando uma despolarização do ovócito (Bleil, 1991). Essa despolarização causa exocitose dos grânulos corticais, que levam a modificações na ZP, causando o chamado bloqueio da zona, ou bloqueio à poliespermia, que previne a entrada de outros espermatozóides. Tais modificações consistem na hidrólise parcial da ZP3 e da ZP2, as quais se tornam ZP3f e ZP2 α (Yanagimachi, 1994). Além disso, o ovócito também é estimulado a completar a segunda divisão meiótica, com expulsão do segundo corpúsculo polar (Palma et al., 2001). Os cromossomos restantes são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino.

Os microfilamentos presentes no córtex do ovócito, agora com pró-núcleos masculino e feminino, são responsáveis pela migração dos pró-núcleos para o centro do citoplasma do ovócito, ocorrendo sua união, processo conhecido por singamia, o qual resulta na formação de um núcleo diplóide que originará um novo indivíduo (Yanagimachi, 1994; Gonçalves et al., 2001).

2.3 Avaliações de Características Físicas e Morfológicas do Espermatozóide

A avaliação espermática tem como objetivo principal prever o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar, entre vários indivíduos aqueles com maior fertilidade, e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade (Amann & Hammerstedt, 1993).

A análise de rotina do sêmen consiste em avaliação subjetiva de motilidade, estimativa da proporção de espermatozóides com morfologia normal e estimativa da concentração de espermatozóides por dose. Porém, não se pode estimar a fertilidade do sêmen baseado nestas avaliações (Rodriguez-Martinez et al., 1997), uma vez que não é avaliada a capacidade do espermatozóide de sofrer alguns processos *in vivo*, tais como a capacitação e a reação acrossômica, necessários para a fecundação (Lonergan et al., 1994).

Sendo assim, o desenvolvimento de ensaios laboratoriais para prever a capacidade fecundante do sêmen tem instigado há muitos anos os pesquisadores. Entretanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen (Graham et al., 1990; Arruda et al., 2003). Por essa razão, têm ocorrido grandes avanços no estudo da célula espermática, permitindo o desenvolvimento de muitas técnicas para avaliar outros aspectos do espermatozóide, tais como: integridade de membrana plasmática e acrossomal, capacitação e integridade da cromatina. A análise destes parâmetros fornece importantes informações sobre a amostra de sêmen.

2.3.1 Avaliação da motilidade e morfologia espermática

A motilidade espermática é uma avaliação importante, pois é essencial para a migração do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea, bem como para a interação dos gametas na fecundação (Rodríguez-Martinez, 2006; Suarez & Pacey, 2006).

O método mais utilizado para avaliação da cinética de movimento espermático é a determinação subjetiva da porcentagem de células móveis em uma amostra de sêmen através de microscopia ótica. Este método é uma forma indireta de avaliação, sendo simples e de baixo custo, no entanto, pode apresentar grande variabilidade (Garner et al., 1997).

Na busca de uma maior objetividade na análise da motilidade, vários métodos têm sido propostos, tais como: passagem contínua, velocidade avaliada por laser, tempo de exposição à fotomicrografia, exposição múltipla de fotomicrografia, microcinematografia (“cine”), videomicrografia e sistema de análise computadorizado do movimento espermático (CASA), permitindo uma avaliação mais exata e objetiva de motilidade (revisado por Mortimer, 1997). Dentre os métodos citados, o CASA tem sido o mais utilizado para avaliação objetiva, fornecendo informações precisas e significativas da cinética da célula espermática (Mortimer, 1997; Cox et al., 2006). Este método baseia-se na obtenção de imagens precisas dos espermatozóides móveis. As imagens são obtidas através de uma leitura do campo avaliado com uma série consecutiva de *flashes* de 1 a 3 milissegundos, com uma frequência de aproximadamente 60 Hz. Após a aquisição, as imagens são imediatamente congeladas, e transmitidas seqüencialmente para o processador de imagens, sendo digitalmente codificados. Cada imagem é então analisada separadamente pelo microprocessador, reconstruindo a trajetória espermática. Este tipo de avaliação determina

não somente a porcentagem de células móveis, mas também quantifica características específicas do movimento espermático (Garner et al., 1997), tais como: velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF) e retilinearidade (LIN). No entanto, o sistema CASA também apresenta algumas desvantagens, como a identificação de debris celulares como célula espermática; a digitalização de espermatozoides aglutinados como sendo um único espermatozoide e junção de trajetória de dois espermatozoides após colisão (Mortimer, 1997).

Sendo a motilidade uma importante variável necessária para a fecundação, diversos estudos têm sido feitos na tentativa de correlacionar motilidade e fertilidade. Para análise visual (estimativa em percentual), o nível de correlação pode variar entre 0,15 e 0,83 (Januskauskas et al., 2003) e para estimativa pela análise computadorizada, entre 0,82 e 0,98 (Farrell et al., 1998). De fato, alguns autores identificaram correlação entre motilidade espermática e fertilidade, tanto pela avaliação subjetiva quanto pela avaliação computadorizada (Januskauskas et al., 2000; Gillan et al., 2008). Para Maxwell e Watson (1996) e Oehninger et al. (2000), em decorrência das alterações nas membranas celulares durante a criopreservação, a viabilidade dos espermatozoides analisada através da motilidade é maior do que sua real capacidade de fecundação.

Além da motilidade, o exame morfológico da célula espermática tem sido utilizado de forma rotineira para seleção e controle de qualidade do sêmen. No entanto a avaliação individual da morfologia espermática, não permite prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, sendo recomendada a avaliação conjunta de outras características espermáticas (Chacón et al., 2001). O sistema de classificação para morfologia espermática foi inicialmente descrito por Langerlöf, em 1934. Mais tarde, Bloom (1973), subdividiu os defeitos morfológicos em primários e secundários. Este sistema foi novamente revisado por Rao (1971), que classificou os defeitos entre maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade. Posteriormente, Saacke et al. (1990) propuseram um novo modelo de classificação espermática, sendo defeitos compensatórios, que estão relacionados com incapacidade ou dificuldade de chegar ao local de fecundação e defeitos não compensatórios, que estão relacionados com a incapacidade de fecundação do ovócito.

Alguns estudos têm demonstrado que a fertilidade de uma amostra de sêmen cai progressivamente à medida que se aumentam as anormalidades morfológicas de espermatozoides presentes na amostra (Saacke et al., 2000). Isto é particularmente observado

em amostras com alta porcentagem de anormalidades de cabeça (Saacke et al., 2000), vacúolos nucleares (Pilip et al., 1995) e anormalidades acrossomais (Thundathil et al., 2002).

Em geral, a fertilidade do touro diminui quando as células espermáticas anormais excedem 20% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores, que incluem cabeça isolada, gota proximal, cauda enrolada, cabeça piriforme, defeitos de acrossoma e defeitos de peça intermediária (Ax et al., 2004).

Para identificação das patologias, diversas técnicas têm sido usadas, incluindo microscopia de campo claro e/ou contraste de fases, contraste interdiferencial (DIC), preparações utilizando corantes, como fucsina eosina, vermelho congo ou rosa bengala e microscopia eletrônica de transmissão (Barth & Oko, 1989).

2.3.2 Avaliação de integridade de membrana plasmática, acrossomal e capacitação

Os espermatozóides são constituídos por vários compartimentos na MP, e a manutenção da integridade e funcionalidade desta membrana é de fundamental importância, visto que uma membrana intacta e funcionalmente ativa é requerida para o metabolismo espermático, capacitação, reação do acrossoma, ligação e penetração do ovócito (Brito et al., 2003). Sendo assim, a avaliação da funcionalidade das membranas parece ser um importante parâmetro para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozóides.

Graham e Mocé (2005) definem integridade de membrana plasmática (IMP) como sinônimo de viabilidade espermática. Muitos estudos basearam-se na idéia de que a membrana plasmática intacta impede certos corantes de penetrarem na célula espermática. Estes estudos foram realizados inicialmente com avaliações de esfregaços secos de corante supravital, como eosina, conjugada ou não com nigrosina (Hancock, 1951) e posteriormente com azul de tripan (Wilson et al., 1969), um corante carregado negativamente que não reage com a célula, a não ser que esta tenha uma lesão de membrana.

Outro método de avaliação da viabilidade da MP baseia-se no princípio fisiológico do teste hipo-osmótico (HOS), desenvolvido por Jeyedran et al. (1984). Segundo os autores, o HOS avalia a integridade funcional da MP e, estando intacta, quando o espermatozóide é incubado em solução hipo-osmótica ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo a membrana se expande

causando o enrolamento da cauda; no entanto, se a membrana estiver danificada, essa reação não ocorre.

Mais recentemente, tem sido desenvolvido e testado o uso de sondas fluorescentes para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou mesmo de potencial de membrana, o que tem provido novas ferramentas para avaliar a funcionalidade do espermatozóide pós-descongelamento (Rodriguez-Martinez et al., 1997). Os estudos iniciais para avaliação da IMP em espermatozoides com o uso de sondas fluorescentes citam o brometo de etídeo (Bilgili & Renden, 1984; Halangk et al., 1984), o qual penetra apenas em células com lesão de membrana, tendo especificidade por DNA, e quando intercalado à dupla hélice, sua fluorescência aumenta (Pal et al., 1998), no entanto devido à sua grande toxicidade, o uso deste fluorocromo tem sido restringido. No entanto, outros corantes fluorescentes com propriedades similares passaram a ser utilizados, tais como o Hoechst 33342 e Hoechst 33258 (De Leeuw et al., 1991; Casey et al., 1993; Celeghini, 2005), Iodeto de Propídeo (IP) (Graham et al., 1990; Harrison & Vickers, 1990; Garner et al., 1999; Celeghini, 2005) e SYBER-14 (Garner et al., 1999; Harrison & Vickers, 1990). Dentre estes, o IP vem sendo mais amplamente utilizado devido à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da IMP (Graham et al., 1990). O IP é um fluorocromo de alta intensidade ao qual a MP íntegra é impermeável. Dessa forma, ele se liga somente ao DNA de espermatozoides cuja membrana está danificada, corando o núcleo de vermelho (Garner et al., 1999).

Atualmente, a associação de sondas fluorescentes vem sendo utilizada, tais como o uso simultâneo de IP e Hoechst 33342 (Casey et al., 1993; Maxwell et al., 1997); IP e Hoechst 33258 (De Leeuw et al., 1991); IP e SYBER-14 (Segovia et al., 2000). Outra sonda que vem sendo amplamente utilizada juntamente com o IP para avaliação de IMP é o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA). O C-FDA é um fluorocromo que penetra rapidamente na MP intacta, ainda na forma não fluorescente. No entanto, no interior da célula, o C-FDA é hidrolizado por esterases, resultando em 6-carboxifluoresceína livre, altamente fluorescente, o qual se torna impermeável à membrana íntegra, sendo retido no interior da célula com MP íntegra, fluorescendo de verde (Garner et al., 1986).

Devido ao grande número de possibilidades de avaliação de IMP por diferentes métodos, comparações entre diferentes tipos de colorações vêm sendo realizadas. Carvalho et al. (2008b) mostraram que a média de porcentagem de espermatozoides com membrana intacta foi similar entre as técnicas de Azul de Tripán e Eosina/nigrosina, que também coincide com a motilidade total das amostras. No entanto, a proporção de espermatozoides

com membrana intacta foi menor quando avaliado por C-FDA/IP. Resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2003).

Tanghe et al. (2002) verificaram uma alta correlação entre número de células íntegras após a FIV e taxa de formação de pró núcleos. No entanto, Brito et al. (2003) não encontraram correlação entre a taxa de fecundação e avaliação de IMP, sugerindo a relação de outros parâmetros espermáticos com a taxa de fecundação, tais como a capacitação e reação do acrossoma.

As mudanças que ocorrem durante a capacitação, antes da reação acrossomal são mais difíceis de serem avaliadas (Pérez et al., 1996). Geralmente, a capacitação do espermatozóide envolve mudanças na MP e metabolismo intracelular do espermatozóide (Bergqvist et al., 2007). Algumas destas alterações são o efluxo de colesterol na membrana, mudanças na sua permeabilidade e um aumento do influxo de íons Ca^+ (Flesh & Gadella, 2000). Baseado nisto, o uso de hidróclorido de clortetraciclina (CTC) tem sido proposta como um método rápido para avaliação de capacitação do espermatozóide (Saling & Storey, 1979). A técnica de fluorescência com CTC tem se mostrado vantajosa, pois permite não apenas a diferenciação entre células com acrossoma intacto e reagido, mas também dividir as células com acrossoma intacto em duas categorias diferentes: não capacitados e capacitados (Gillan et al., 1997). A CTC é uma sonda fluorescente quelante do Ca^{2+} . Desta forma a molécula de CTC possui a habilidade de indicar a localização de Ca^{2+} na membrana. Durante a capacitação, modificações na distribuição da fluorescência da CTC, são observadas em resposta às alterações na MP da cabeça do espermatozóide (Saling & Storey, 1979), demonstrando diferentes padrões de colorações, o qual reflete diferentes estágios do processo de capacitação (Fraser et al., 1995). Inicialmente a técnica foi testada em camundongos (Saling & Storey, 1979) e posteriormente testados em outras espécies, sendo estipulados três padrões de fluorescência: padrão F, do inglês *Full*, devido à característica da cabeça do espermatozóide apresentar-se com completa fluorescência, indicando espermatozóides não capacitados e com acrossoma intacto; padrão B, do inglês *Banded*, devido à fluorescência estar distribuída de forma brilhante na região acrossomal e ausência de brilho na região pós acrossomal, indicando espermatozóides capacitados e com acrossoma intacto; e padrão AR, do termo *acrosome reaction*, que corresponde à ausência de brilho fluorescente na cabeça, indicando espermatozóides com reação acrossomal (Fraser et al., 1995; Cormier et al., 1997).

Assim como para as demais características espermáticas, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de correlacionar a avaliação de capacitação e fertilidade. Gillan et al. (2008) e Collin et al. (2000) não identificaram correlação entre os padrões de coloração

com CTC e taxa de fertilidade. Já Thundathil et al. (1999), identificaram que a proporção de células não capacitadas pode estar correlacionada a dados de fertilidade de touros a campo.

Para avaliação da condição acrossomal, assim como para IMP, um maior número de técnicas pode ser utilizado. Dentre elas, a dupla coloração com azul de tripan e Giemsa (Didion et al., 1989), ou diferentes técnicas de fluorescência, tais como LysoTracker Gren DND-26 (LYSO-G) (Thomas et al., 1997), anticorpos anti-acrosina (Thomas et al., 1997) e anticorpos anti-hialuronidase (Baccetti et al., 1999). Outro meio de mensurar a integridade acrossomal é através do uso de lecitinas conjugadas. As lecitinas conjugadas se ligam a glucose, mannose, galactose e N-acetilglucosamina ou outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. Dependendo da espécie de mamífero, as lecitinas mais comumente utilizadas são *Psium sativum* (Green pea) (PSA) ou *Arachis hypogaea* (peanut; PNA) (Silva & Gadella, 2006), podendo citar ainda *Triticum vulgare* (WGA) (Baker et al., 2004; Silva & Gadella, 2006) ou *Conconavalina ensiformis* (ConA) (Silva & Gadella, 2006). Para visualização em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tal como o isoticianato de fluoresceína (FITC) (Baker et al., 2004) ou R-ficoeritrina (RPE) (Gadella & Harrison, 2000). As lecitinas são impermeáveis ao acrossoma intacto, no entanto a reação acrossomal ou acrossoma danificado permite a entrada destas macromoléculas. O PNA se liga a glicoproteínas da membrana acrossomal externa e o PSA se liga a componentes enzimáticos da matriz na luz do acrossoma, se ligando especificamente ao açúcar α -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal (Cross & Meizel, 1989; Silva & Gadella, 2006). Para células não fixadas, a presença de coloração verde na região do acrossoma indica acrossoma reagido. Em espermatozóides que foram fixados e permeabilizados, o acrossoma fluorescente é considerado intacto (Silva & Gadella, 2006).

Assim como para IMP, a grande variedade de testes para avaliação acrossomal pode apresentar diferença nos resultados para uma mesma amostra. Carvalho et al. (2008a) identificaram maior porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma íntegro pelo uso do corante azul de tripan e Giemsa, em relação à técnica de coloração com PNA. Valcárcel et al. (1997), trabalhando com três tipos de lecitinas conjugadas (PNA, PSA e WGA), não encontraram diferença nos resultados, indicando que as técnicas utilizando diferentes lecitinas podem apresentar resultados semelhantes. Mocé & Grahan (2008) identificaram uma correlação entre o número de espermatozóides vivos com acrossoma íntegro e a motilidade, independentemente se avaliada subjetivamente ou pelo CASA. Em relação à fertilidade, Chan et al. (1996) encontraram correlações positiva entre a porcentagem de espermatozóides com

acrossoma intacto e a taxa de fecundação em ovócitos “zona-free” de hamster. Já Gillan et al. (2008) não encontraram correlação entre a porcentagem de células com acrossoma íntegro e a fertilidade. Resultado semelhante foi observado por Mocé et al. (2006), no entanto, quando estes autores agruparam avaliação de outras características espermáticas, ocorreu um aumento na correlação com a fertilidade. Estes dados sugerem que a integridade da membrana acrossomal pode estar relacionada também com a integridade de outras membranas e também com a motilidade celular.

2.3.3 Avaliação da integridade de cromatina

Para avaliação da cromatina, diversas técnicas podem ser utilizadas, sendo que os primeiros estudos sobre mudanças na organização do núcleo espermático, nos bovinos, foram descritos por Ghedhill (1966). Em 1969, McCosker descreveu, originalmente, a presença de alterações na cromatina em espermatozóides com vacúolos nucleares (*pouch*), associando-as à infertilidade.

As alterações na cromatina originam-se a partir da diferenciação pós-meiótica, especificamente, durante o remodelamento nuclear, e estão intimamente associadas à presença de “fendas” no DNA e anormalidades na topoisomerase II, enzima responsável pela reparação contínua de pequenas alterações no DNA. A inibição ou falha da topoisomerase II, antes de completar a espermiogênese, pode favorecer o aparecimento de fragmentação no DNA ou, em parte, da cromatina nuclear (Risley et al., 1986).

De acordo com Beletti et al. (2005), na maioria dos mamíferos, a cromatina espermática possui dois tipos de protaminas, P1 e P2 e alterações na proporção destas protaminas são causas importantes de anormalidades na cromatina. No entanto, a célula espermática dos bovinos tem somente um tipo de protaminas, sugerindo que alterações na cromatina desta espécie sejam ocasionadas por outros fatores. Tais fatores podem ser agentes tóxicos e patogênicos, mutação gênica e cromossomal, altos níveis de estresse oxidativo e, mais frequentemente, pela perda da termorregulação testicular (Karabinus et al., 1997). Todos estes fatores podem resultar em uma baixa condensação da cromatina, gerando danos ao DNA, como a presença de fitas quebradiças. No entanto, alguns espermatozóides com anormalidades na cromatina podem fecundar o ovócito, porém, problemas na cromatina do

espermatozóide podem levar a morte embrionária, por gerar embriões degenerados (Ellington et al., 1998).

Para identificação do nível de fragmentação ou condensação anormal da cromatina, diversas técnicas podem ser utilizadas. De acordo com Evenson et al. (2002), há uma relação distinta entre suscetibilidade do DNA à desnaturação e a presença de fraturas ou quebras na estrutura do DNA. No primeiro caso são usados testes para identificar a estabilidade da estrutura da cromatina. Estes testes incluem o terminal *dexynucleotidyl transferase mediated dUDP Nick-end labeling* (TUNEL) (Martins et al., 2007), *single cell gel electrophoresis* (COMETA) (Hellman et al., 1995), *sperm chromatin structure assay* (SCSA) (Evenson et al., 2002), e *acridine Orange test* (AOT) (Martins et al., 2007). No caso de condensação anormal da cromatina, pode-se identificar fragmentações nucleares com as colorações de *Fuelgen* (Evenson et al., 2002) e azul de toluidina (ATOL) (Beletti et al., 2004). É importante destacar que diferentes técnicas são usadas para avaliar condensação e estabilidade da cromatina espermática. As colorações de *feugen* e ATOL são usadas na avaliação da condensação anormal da cromatina. Os testes que incluem COMETA, TUNEL, SCSA e AOT são usados para identificar a estabilidade da estrutura da cromatina (Evenson et al., 2002).

Dentre os testes citados, o AOT é comumente utilizado pela facilidade de seu preparo. O fluorocromo alaranjado de acridine avalia a estabilidade do DNA à desnaturação ácida ou pelo calor, assim, o fluorocromo se intercala à fita dupla íntegra de DNA na forma de monômero e fluoresce de verde. No entanto, caso o DNA encontra-se danificado, o fluorocromo se liga à fita de DNA em forma de agregado, emitindo fluorescência vermelho/alaranjado, permitindo contar o número de células com DNA desnaturado (Kosower et al., 1992; Agarwal & Said, 2003).

A coloração com ATOL detecta os espermatozoides com DNA fragmentado. Assim, no espermatozóide anormal a cromatina está pouco condensada e o complexo DNP alterado, havendo, portanto, um maior número de grupos fosfato disponível para a ligação com o corante, sendo observada uma coloração azul escuro ou violeta (Belletti et al., 2004).

Provavelmente, devido à grande estabilidade da cromatina espermática, as porcentagens de fragmentação e vacuolização nuclear nos espermatozoides bovinos geralmente são baixas (Barth & Oko, 1989). No entanto, a sua relação com a taxa de fertilidade e desenvolvimento embrionário é variável. Pilip et al. (1995) verificaram um menor percentual de fertilidade *in vitro* ao se utilizar sêmen com aproximadamente 80% de fragmentação nuclear, enquanto que Thundathil et al. (1999) não encontraram diferença na

taxa de clivagem e blastocistos em touros com alta e baixa porcentagem de DNA fragmentado.

2.4 Avaliação Funcional da Célula Espermática

Alguns métodos *in vitro* de avaliação funcional da célula espermática podem ser realizados, tais como fecundação competitiva (teste heterospermico), ligação ou aderência a ZP e taxa de fecundação (Saacke et al., 2000).

2.4.1 Produção *in vitro* de embriões

A PIV é a técnica que permite um maior aproveitamento do uso do sêmen, permitindo a utilização de reprodutores com alto valor comercial, além do uso do sêmen sexado (Faber et al., 2003). De fato, a técnica de PIV em conjunto com o sêmen sexado apresenta-se, atualmente, como a associação de biotécnicas mais aconselhável para a geração de descendentes com sexo pré-determinado. Isso se deve ao fato da PIV otimizar o aproveitamento do sêmen sexado em relação à quantidade de embriões produzidos, por permitir que doses comerciais de sêmen sexado, mesmo apresentando um número limitado de espermatozoides, possam ser compartilhadas entre ovócitos provenientes de mais de uma doadora (Dell'Aqua et al., 2006).

A PIV compreende a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos, a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV), sendo que o início deste processo ocorre com a recuperação dos ovócitos presentes no interior dos folículos. Os ovócitos podem ser obtidos dos folículos através de aspiração folicular guiada por ultrassom em animais vivos ou através de ovários de vacas abatidas, sendo esta a principal fonte de ovócitos utilizados nas pesquisas (Dode et al., 2002). Após a recuperação e seleção, os ovócitos são submetidos a MIV, durante a qual ocorrem diversas alterações nucleares e citoplasmáticas que preparam o ovócito para ser fecundado.

O processo de maturação nuclear envolve a retomada da meiose, culminando com o final da primeira divisão meiótica e a expulsão do primeiro corpúsculo polar (CP). *In vitro*, esta fase é reiniciada logo após a retirada do ovócito do ambiente folicular (Lonergan et al., 2003), com quebra da vesícula germinativa (Sirard & First, 1988) e posterior progressão da meiose para o estágio de metáfase II (Van den Hurk & Zhao, 2005). Os ovócitos ficam retidos em metáfase II até a fecundação ou ativação partenogenética.

A maturação citoplasmática envolve o aumento das gotículas de lipídios, reserva energética para o provável embrião, alterações no complexo de Golgi, alterações no formato das mitocôndrias, indicando uma maturação mitocondrial e migração dos grânulos corticais para a periferia do ovócito, para evitar a polispermia no momento da fecundação (Merton et al., 2003).

Para a MIV os ovócitos bovinos são, esses são cultivados por um período de 22-24 horas utilizando normalmente como base o meio para cultivo de tecido 199 (TCM 199) com sais de EARLE (Ayoub & Hunter, 1993). Este meio pode ser modificado de acordo com os protocolos de cada laboratório, podendo ter diversas fontes de suplementação energética. Além da composição do meio, outros fatores como pH, osmolaridade, composição iônica, temperatura da estufa e tensão de CO₂ e O₂ são importantes para que a maturação ocorra com sucesso (Nagai, 2001).

A etapa seguinte é a FIV, a qual depende, além da qualidade dos ovócitos, da qualidade dos espermatozóides utilizados (Hansen, 2006). Portanto, após a maturação, os ovócitos são expostos aos espermatozóides para que ocorra a fecundação. Neste processo estão envolvidas várias etapas, culminando com a penetração do ovócito pelo espermatozóide e formação de um núcleo diplóide que originará um novo indivíduo (Gonçalves et al., 2001). Para a FIV, realiza-se inicialmente a seleção dos espermatozóides, com o objetivo de remover o plasma seminal e o crioprotetor e aumentar a concentração de espermatozóides de boa qualidade (Parrish et al., 1995). Além disso, as técnicas de seleção separam os espermatozóides vivos dos mortos, evitando os efeitos deletérios que os espermatozóides mortos possam exercer. A separação por gradiente de densidade (*Percoll*) e o método de migração de espermatozóides pelo *swim-up* são as técnicas mais utilizadas para seleção de espermatozóides viáveis, porém outras técnicas como a lavagem do sêmen, também podem ser utilizadas sem afetar o sucesso da FIV. O gradiente de *Percoll* proporciona uma maior recuperação quando comparado ao *swim-up*, entretanto a qualidade e viabilidade dos espermatozóides recuperados é semelhante em ambos os métodos (Rho et al., 2001).

Além da seleção, outro passo importante é a capacitação e a hiperativação da célula espermática, aumentando sua atividade e facilitando a sua penetração no ovócito (Gonçalves et al., 2001; Palma et al., 2008). Esta hiperativação e capacitação normalmente são induzidas com a adição ao meio de fecundação dos aminoácidos penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) e heparina.

Para a FIV, os espermatozóides e ovócitos maduros são co-incubados em meio específico, por um período de aproximadamente 18 horas, em temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2001). Após a fecundação os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecem até atingirem o estágio de blastocisto. Para atingirem o estágio de blastocisto, muitos eventos importantes ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. Isto inclui a primeira clivagem, a ativação do genoma embrionário, no estágio entre oito e 16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 após a FIV. A partir deste momento, se estabelece a formação de dois tipos celulares, o trofotoderma e a massa celular interna (Lonergan et al., 2003).

Apesar da qualidade do ovócito ser um fator determinante para que o embrião PIV possa chegar ao estágio de blastocisto, as condições de cultivo podem influenciar, principalmente, a qualidade dos embriões (Lonergan et al., 2003). Estas condições envolvem vários fatores, dentre eles: o tipo de meio, a atmosfera gasosa, a densidade, ou seja, a quantidade de embriões/volume de meio, a presença ou não de co-cultivo e o tipo de suplementação protéica (Donnay et al., 1997; Wrenzycki et al., 2001).

Para o sistema de cultivo, vários tipos de meio têm sido utilizados. O TCM 199 é um meio de cultivo desenvolvido para o cultivo celular em geral (Tervit et al., 1972), enquanto que o fluido sintético de oviduto (SOF) é um meio direcionado para a produção de embriões.

A densidade ou número de embriões cultivados por volume de meio, também afeta a eficiência do sistema de produção. Embriões bovinos produzidos em grupo adquirem maior competência para o desenvolvimento do que embriões cultivados individualmente (Donnay et al., 1997). Outro fator importante para alcançar a eficiência do sistema de CIV é a presença ou ausência de co-cultivo. O co-cultivo pode ser realizado com vários tipos de células somáticas, como células do *cummulus* ou da granulosa. Além de proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento dos embriões, as células do co-cultivo protegem os ovócitos e embriões contra o estresse oxidativo provocado pelas condições de cultivo, proporcionando maior produção embrionária (Fatehi et al., 2005).

Além da qualidade dos ovócitos e do ambiente de cultivo, outro fator importante que afeta o sucesso da PIV é o touro, sendo esta uma grande fonte de variação. De fato, Palma e Sinowatz (2004) realizaram um estudo no qual utilizaram, na PIV, sêmen de 63 touros que na IA haviam apresentado taxa de prenhez aos 60 a 90 dias de 65 a 75% e observaram taxas de blastocisto variando de 6,9 a 51,2%. Esta variação entre touros na taxa de blastocisto na PIV também foi demonstrada por outros autores (Cesari et al., 2006; Alomar et al., 2008).

Outro ponto importante a ser observado é a cinética de desenvolvimento embrionário entre embriões machos e fêmeas. De acordo com Peippo et al. (2001), embriões machos clivam mais rapidamente do que embriões fêmeas, atingindo um estágio de quatro células cerca de 2 horas mais cedo. Avery et al. (1991) e Gutiérrez-Adán et al. (2000), também encontraram diferenças entre embriões machos e fêmeas. Eles observaram que embriões machos produzidos *in vitro* crescem mais rápido do que embriões fêmeas durante os 7 a 8 primeiros dias após a fecundação. Estes resultados contrastam com os encontrados por Grisart et al. (1995) e Holm et al. (1998) que não observaram diferença na cinética de desenvolvimento de embriões machos e fêmeas produzidos *in vitro*.

2.5 Determinação do Sexo em Mamíferos

Diferentes metodologias vêm sendo testadas a fim de determinar ou identificar o sexo em mamíferos. Nesse sentido, existem duas alternativas: sexagem de embriões ou separação dos espermatozoides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y (Hossepian de Lima, 2006).

Para identificação do sexo dos embriões, algumas técnicas têm sido descritas, sendo que os métodos podem ser divididos em duas categorias: as não invasivas, como a quantificação de enzimas ligadas ao cromossomo X e testes imunológicos e as invasivas, que incluem análise citogenética e o método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR; Gardón et al., 2004).

2.6 Seleção de Espermatozóides Contendo Cromossomo X ou Y

Para a separação do espermatozóide contendo o cromossomo X daqueles que contêm o Y, tem-se testado uma tecnologia que possa ser inserida na indústria de produção de sêmen congelado e que tenha aplicabilidade comercial. A separação dos espermatozóides portadores do cromossomo X daqueles portadores do Y baseia-se na detecção de diferenças físicas ou químicas entre esses dois tipos de células (Hossepian de Lima, 2006). Portanto, a separação pode ser feita por: sensibilidade ao pH (Emmens, 1960), carga elétrica da superfície da membrana (Gordon, 1957; Kaneko et al., 1984), morfologia do núcleo e da cabeça (Shettles, 1960), antígenos de superfície (Koo et al., 1973) e diferença no conteúdo de DNA (Johnson et al., 1987; 1989).

No entanto, entre as técnicas citadas, apenas as que se baseiam no método imunológico ou por diferença no conteúdo de DNA vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas.

2.6.1 Métodos imunológicos para identificação de proteínas de membrana específicas para espermatozóides contendo o cromossoma X ou Y

A presença do antígeno H-Y na membrana dos espermatozóides foi relatada pela primeira vez por Goldberg et al. (1971). Estudos para verificar esta hipótese foram conduzidos em camundongos por Bennet e Boyse (1973), em que soro anti H-Y foi adicionado ao sêmen previamente à IA. Mediante esta técnica os autores conseguiram uma progênie de 45,5% de machos, em comparação a 53,4% do grupo controle.

Blecher et al. (1999), incubaram amostras de espermatozóides bovinos com anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino, promovendo aglutinação de 50% das células. As células que não sofreram aglutinação produziram embriões *in vitro*, que foram sexados por citogenética, e 92% destes foram do sexo masculino. Não foi relatado se a incubação de espermatozóides com anticorpos antiproteínas macho específica, também promoveria o desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino.

Blecher et al. (1999) relataram a identificação e isolamento de proteínas específicas do sexo para obtenção de anticorpos específicos do sexo masculino e do sexo

feminino. No entanto, estudos eletroforéticos da membrana dos espermatozóides X e Y, separados por citometria de fluxo, têm demonstrado que não é possível identificar diferenças entre as proteínas de membrana dos portadores do cromossomo X e Y (Hendriksen et al., 1999). Este fato poderia ser explicado pela existência de vários mecanismos biológicos como a possível troca de mRNA devido à presença de pontes citoplasmáticas entre as espermátides X e Y (Ericksson et al., 1981), além de alguns autores levantarem a hipótese de que espermatozóides X poderiam reter na membrana atígeno H-Y.

2.6.2 Diferença no conteúdo de DNA

A quantidade de DNA dos cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e, até o momento, é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente dos espermatozóides X ou Y, *in vitro* (Johnson, 1994).

Summer e Robinson (1976) demonstraram que os espermatozóides X contêm mais DNA e proteína nuclear do que os espermatozóides Y, e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. Como revisado por Garner (2006) e Hossepian de Lima (2006), a análise dos espermatozóides X ou Y de várias espécies por mensuração das cromátides ou por citometria de fluxo, revelou que a diferença no conteúdo de DNA varia de 2,8% na espécie humana a 12,5% no *Microtus oregoni*.

Nos animais domésticos, as diferenças de DNA entre os espermatozóides X ou Y variam de 3,5% a 4,2%, sendo que nos bovinos ela é de aproximadamente 4%. Nesta espécie, observou-se uma diferença média do conteúdo de DNA dos espermatozóides X ou Y entre as raças, mas não entre os indivíduos da mesma raça. Entre os espermatozóides X ou Y de touros Jersey observou-se a maior diferença (4,24%) quando comparados às raças Angus (4,05%), Hereford (4,03%), Holandês (3,98%) e Brahman (3,73%). Com base nesta diferença, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozóides: a sedimentação ou centrifugação em gradiente de densidade e a citometria de fluxo.

2.6.2.1 Sexagem por gradiente de sedimentação ou centrifugação

Os procedimentos envolvendo sedimentação ou centrifugação de espermatozóides baseiam-se na diferença de densidade existente entre os portadores do cromossomo X ou Y. Esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. A grande quantidade de água e de lipídeos contida na cabeça dos espermatozóides, já que o DNA corresponde a apenas 18% da massa, faz com que a diferença do conteúdo de DNA produza uma pequena diferença no peso e, conseqüentemente, na densidade (Hossepian de Lima, 2006).

Estimou-se que a diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de pelo menos $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ ou 0,06% (Chandler et al., 1999). Os autores ressaltaram que esta diferença faz com que a separação dos espermatozóides seja possível desde que se utilizem gradientes com alta resolução de densidade.

Os gradientes de densidade podem ser divididos em dois grupos: contínuos, onde há um aumento gradual da densidade, da parte superior do gradiente até a parte inferior, não sendo possível observar as camadas formadas; e descontínuos, onde é possível visualizar as camadas dos gradientes, sendo que a camada mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo nas partes superiores (Hossepian de Lima, 2006).

Para a formação do gradiente contínuo, há necessidade de se montar um gradiente descontínuo de três a quatro camadas inicialmente, no qual a transformação ocorre pela difusão destas camadas, colocando-se o tubo na horizontal, e em seguida, reorientando-o para a posição vertical. A difusão das camadas também pode ocorrer através do resfriamento de um gradiente descontínuo. A vantagem do gradiente contínuo é que ele pode ser feito com densidades maiores (e de maior resolução) e pode ser estocado ou refrigerado, ao contrário do gradiente descontínuo que se for estocado por algum tempo, pode ter as camadas misturadas (Pergorato & Hossepian de Lima, 2001).

Em estudo visando a seleção de espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y, através de sedimentação em diferentes gradientes de *Percoll*, foi identificado a separação do espermatozóide X ou Y, de aproximadamente 74%, utilizando para aferir este resultado a maior fluorescência do corpúsculo F, presente no cromossomo Y, quando corado com Quimacrina mostarda (Hossepian de Lima, 1998) ou verificação por hibridização *in situ* (Blottner et al., 1993).

2.6.2.2 Sexagem por citometria de fluxo

Na década de 80 (Johnson et al., 1987; 1989) iniciaram em mamíferos, tentativas para a seleção de subpopulações espermáticas pela identificação das diferenças na quantidade de cromatina entre os espermatozóides X ou Y por citometria de fluxo. Em 1993, Chan e colaboradores utilizaram para FIV, pela primeira vez, espermatozóides X e Y de bovinos, separados por citometria de fluxo. Desde então muitas pesquisas foram realizadas na tentativa de aumentar a velocidade de sexagem e melhorar a qualidade da célula espermática após sexagem por citometria de fluxo. Em 2001, a tecnologia foi adaptada para produção comercial pela XY Inc. (Sexing Technologies, Novasota, TX) para sêmen de bovinos.

Assim como na diferença de densidade, a sexagem por citometria de fluxo se baseia na diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozóides contendo cromossomo X ou Y. Esta pequena diferença pode ser medida pelo citômetro de fluxo, com cerca de 90% de acurácia para 50% dos espermatozóides, sendo os outros 50% descartados (Seidel Jr, 2007).

A diferença de conteúdo de DNA dos espermatozóides pode ser determinada usando um fluorocromo, Hoechst 33342, que ultrapassa rapidamente a membrana celular dos espermatozóides e se ligando seletivamente à dupla fita de DNA. A ligação do Hoechst 33342 ao DNA é estabilizada por pontes de hidrogênio, Van de Waals e interações eletrostáticas entre o corante e o DNA (Garner, 2009). Um outro corante, como IP pode ser adicionado à amostra durante o preparo, com a finalidade de identificar células mortas (com membrana danificada), permitindo que somente células vivas (com membrana íntegra) sejam sexadas (Johnson, 2000). Após incubação com corante, os espermatozóides apresentam fluorescência azul quando expostos a um raio *laser* de onda curta, que emite uma luz ultra-violeta de 175 mW (351-363 nm). A fluorescência emitida por cromossomo é proporcional ao seu tamanho. Os espermatozóides passam pelo citômetro de fluxo por uma fila única, em alta velocidade e pressão, onde recebem o laser. Os espermatozóides contendo o cromossomo X emitem um sinal de fluorescência maior que os que possuem o cromossomo Y, devido ao seu maior conteúdo de DNA. Os sinais fluorescentes emitidos são recebidos simultaneamente por detectores óticos colocados a 0° e 90° em relação à face plana e extremidades da cabeça, respectivamente. Os detectores convertem estes sinais em sinais eletrônicos que são armazenados em um computador como um histograma. À medida que a corrente de fluido contendo os espermatozóides saem pelo classificador, este é vibrado em alta frequência (60 a 70 KHz), causando a formação de gotas individuais (correspondendo à formação de uma

gota no período de 16 a 14 μ s, respectivamente para cada frequência) a uma taxa de aproximadamente 70.000 a 80.000/seg (Schenk et al., 1999; Pergorato & Hossepian de Lima, 2001). Cerca de um terço destas gotas contém um espermatozóide, os outros dois terços podem estar vazios e uma pequena porcentagem das gotas contém dois ou mais espermatozóides. As gotas contendo um espermatozóide X, identificado pelo computador, recebem uma carga elétrica positiva, enquanto as gotas contendo um espermatozóide Y recebem uma carga elétrica negativa. As gotas que não possuem espermatozóides, que apresentem mais de um espermatozóide, espermatozóides identificados como danificados ou que não foi possível distinguir a relativa diferença de DNA, não recebem carga elétrica (Seidel Jr, 2007). As gotas contendo espermatozóide X ou Y, com carga elétrica positiva ou negativa, respectivamente, saem do citômetro de fluxo, a uma velocidade de 80 a 100 km/h, e pressão de 40 a 50 psi, passando por um campo elétrico com placas carregadas positivamente ou negativamente. Desta maneira, as gotas contendo espermatozóides X, Y ou sem carga elétrica são encaminhadas para três diferentes tubos coletores (Schenk et al., 1999).

Visando tornar este processo cada vez mais eficiente, pequenas modificações têm sido feitas na tentativa de melhorar a qualidade do sêmen sexado por citometria de fluxo, dentre elas: orientação do laser, vibração acústica, orientação das células e velocidade e pressão de passagem, podendo sexar cerca de 8000 espermatozóides/seg, produzindo aproximadamente 14 palhetas de cada sexo por hora por citômetro (Sharpe & Evans, 2009). No entanto, apesar das modificações e precisão de aproximadamente 90%, o sêmen sexado por citometria de fluxo ainda apresenta algumas falhas, como o comprometimento parcial da viabilidade e da fertilidade espermática (Garner, 2006; Wheeler et al., 2006).

Blondin et al. (2009), avaliando sêmen contendo espermatozóide sexado X e não sexado, fresco e congelado, de três diferentes touros identificaram uma queda na motilidade do sêmen de todos os touros após o processo de sexagem por citometria de fluxo. Estes autores também identificaram que o processo de congelamento e não de sexagem causou um aumento na porcentagem de espermatozóides com acrossoma reagido, danos de membrana e atividade mitocondrial. Resultados semelhantes foram encontrados por Klinc et al. (2007) ao incubar sêmen sexado com antioxidante e BSA.

Boe-Hanson et al. (2005) e Blondin et al. (2009), avaliando integridade de DNA entre sêmen sexado e não sexado identificaram uma maior porcentagem de DNA íntegros em espermatozóides com cromossomo X e Y em relação ao não sexado, sugerindo que nestes trabalhos, o processo de sexagem pode ter descartado previamente espermatozóides com cromatina danificada.

Parrilla et al. (2004), demonstraram que a taxa de prenhez e tamanho da leitegada não foram afetadas pela concentração do Hoechst 33342, concluindo que tanto o corante quanto a incidência do laser não ocasionariam efeitos genotóxicos em leitões adivindos de inseminações com espermatozóides sexados. Da mesma forma, Zhang et al. (2003) em estudo com bovinos, não observaram diferenças significativas entre as taxas de produção de embriões utilizando sêmen sexado, sêmen submetido somente ao corante para sexagem ou sêmen convencional, concluindo que a separação dos espermatozóides ou o corante utilizado para a separação por citometria de fluxo não interferiram no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Entretanto, outros estudos têm mostrado que as taxas de produções de embriões e gestação são inferiores quando sêmen sexado é utilizado. Vacas inseminadas com sêmen sexado criopreservado apresentaram taxas de fecundação ou prenhez de 10 a 30% menores que as do grupo controle com utilização de sêmen não sexado (Lu et al., 1999; Seidel et al., 1999; Sartori et al., 2004; Bodmer et al., 2005; Shenk et al., 2005; Andersson et al., 2006).

Estes estudos demonstram uma grande variação de resultados quanto à utilização do sêmen sexado, não sendo ainda muito bem elucidadas as causas destas variações ou das menores taxas de fertilidade do sêmen sexado comparado ao não sexado.

Portanto, são necessários estudos para verificação das possíveis alterações causadas na célula espermática durante o processo de sexagem (Dell'Aqua Jr. et al., 2006). Este conhecimento permitirá estabelecer procedimentos mais adequados, que possibilitem um melhor aproveitamento do sêmen sexado associado a melhores resultados quando da utilização deste sêmen na produção de embriões.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL A.; SAID, T.M. Role sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 331-345, 2003.
- 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.
- AMMAN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 317-325, 1993.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 95-97, 2006.
- AREEKIJSEREE, M.; VEERAPRADITSIN, T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. **Micron**, v. 39, p. 160-167, 2007.
- ARRUDA, R.P.; BALI, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 228-229, 2003.
- EVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine in vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 35, p. 953-963, 1991.
- 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: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 369-394.
- AYOUB, M.A.; HUNTER, A.G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 95-100, 1993.

- BACCETTI, B.; GAMBERA, L.; MORETTI, E.; PIOMBONI, P. A quick molecular method for the simultaneous detection in spermatozoa of nuclear, acrosomal and axonemal structure by fluorescent microscopy. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 31, p. 563-569, 1999.
- BAKER, S.S.; THOMAS, M.; THALER, C.D. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 744-751, 2004.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press, 1989. 285 p.
- BENNET, K.J.; BOYSE, E.A. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. **Nature**, v. 246, p. 308-9, 1973.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 22, p. 85-90, 2005.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotech Histochemical**, v. 79, p. 17-23, 2004.
- BERGQVIST, A.S.; BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Heparin and dermatan sulphate induced capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa measured by merocyanine-540. **Zygote**, v. 15, p. 225-232, 2007.
- BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration. **Poultry Science**, v. 63, p. 2275-2277, 1984.
- BLECHER, S.R.; HOWIE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L.M.; A new approach to immunological sexing sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1309-1322, 1999.
- BLEIL, J.D. Sperm receptors of mammalian eggs. In: WASSARMAN, P.M. **Elements of Mammalian Fertilization**. 1 ed. Boca Raton: Florida, 1991. p. 133-202.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.
- BLOOM, E. Interpretation of spermatid cytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 233-238, 1950.
- BLOTTNER, S.; SCHWERIN, M.; BOTTCHER, M.; PITRA, C. Selective enrichment of bovine X and Y spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Archive für Tierzucht**, v. 36, p. 153-162, 1993.
- BOATMAN D.E.; MAGNONI, G.E. Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 199-207, 1995.

- BOE-HANSEN, G.B.; MORRIS, I.D.; ERSBOLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.
- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DEN DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 43-48, 2005.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.
- CARDULLO, R.A.; FLORMAN, H.M. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. **Method in Enzymology**, v. 225, p. 1326-1353, 1993.
- CARVALHO, J.O.; MACHADO, G.M.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Comparison of different techniques to evaluate membrane and acrosome integrity of bovine cryopreserved sperm cells. In: XXV JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2008, Budapest. **Anais...Oral and Poster Abstract, XXV Jubilee World Buiatrics Congress**, n. 905, p. 205, 2008a.
- CARVALHO, J.O.; MACHADO, G.M.; SIQUEIRA FILHO, E.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Comparison of different methods to evaluate the plasma membrane of bovine sperm. In: SIMPÓSIO DE MICROSCOPIA DO CERRADO, 2008, Pirinópolis. **Anais...Simpósio de Microscopia do Cerrado**, p. 179, 181, 2008b.
- CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 289-297, 1993.
- CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2005. 186p. Tese de doutorado.
- 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.
- CHACÓN J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 91-99, 2001.
- CHAN, P.J.; CORSELLI, J.U.; JACONSON, J.D.; PATTON, W.C.; KING, A. Correlation between intact sperm acrosome assessed using the spermatic stain and sperm fertilizing capacity. **Journal of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996.

- CHANDLER, J.E.; WILSON, M.P.; CANAL, A.M.; STEINHOLT-CHENEVERT, H.C. Bovine spermatozoa head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenology**, v. 15, p. 1021-1034, 1999.
- CHASTANT-MAILLARD, S., DRUAT, X. Sexagem de espermatozóide bovino. **A Hora Veterinária**, v. 143, p. 43-48, 2005.
- CHENG, F.P.; WU, J.T.; CHAN, J.P.; WANG, J.S.; FUNG, H.P.; COLENBRANDER, B.; TUNG, K.C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, p. 1605-1616, 2004.
- COLLIN, S.; SIRARD, M.A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to their in vitro fertility of cryopreserved bovine semen. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 938-943, 2000.
- CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.
- CROSS, N.L.; LAMBERT, H.; SAMUELS, S. Sperm binding activity of the zona pellucida of immature mouse oocyte. **Cell Biology International Reproduction**, v. 10, p. 545-554, 1986.
- CROSS N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 112-118, 1991.
- DELL'AQUA JR, J.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. In: a XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 346 (supl 1), 2006, Araxá. **Anais...** Araxá: Acta Scientiae Veterinariae, p. 205-212, 2006.
- DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, p. 51-57. 1989.
- DODE, M.A.N.; MATTOS, L.; RUMPF, R. In vitro production of bovine embryos in SOFaaf medium under high oxygen tension. **Theriogenology**, v. 57, p. 661, abstract, 2002.
- DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.;

- VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A. Effect of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos, **Theriogenology**, v. 47, p. 1549-1561, 1997.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL E.; NEIL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2ed. Raven Press: New York, 1994. p. 29-77.
- ELLINGTON, J.E.; EVERSON, D.P.; FLEMING, J.E.; BRISBOIS, R.S.; HISS, G.A.; BRODER, S.J.; WRIGHT, R.W. Co-culture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 643-649, 1998.
- EMMENS, C.W. Insemination pH and the sex ratio in rabbits. **Journal Hered**, v. 51, p. 156-157, 1960.
- ERICKSSON, R.P.; LEWIS, S.E.; BUTTLEY, M. Is haploid gene expression possible for sperm antigen? **Journal of Reproduction Immunology**, v. 3, p. 195-217, 1981.
- EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detection sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 25, 43, 2002.
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRE, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1998.
- FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLEMBRANDER, B.; SCHOEVERS, E.J.; GADELLA, B.M.; BEVERST, M.M.; VAN DEN HURK, R. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v. 13, p. 177-185, 2005.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FLESCH F.M.; WIJNAND, E.; VAN DE LEST, C.H.; COLEMBRANDER, B.; VAN-GOLDE, L.M.; GADELLA, B.M. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 107-115, 2001.
- FRASER, L.R.; ABEYDEERA, L.R.; NIWA, K. Ca^{2+} regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 233-241, 1995.
- GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.

- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, JF.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.
- 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. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.
- GARNER, D.L. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 11-21, 2009.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 97-110.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJANETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 399-404, 1999.
- GHEDHILL, B.L. Studies on the DNA content dry mass and optical area of ejaculated spermatozoa heads from bulls with normal and lowered fertility. **Acta Veterinary Scand**, v. 7, p. 166-174, 1966.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, M.C. Capacitation status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 481-488. 1997.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008.
- GOLDBERG, E.H.; BOYSE, E.A.; BENNETT, D.; SCHEID, M.; CARSWELL, E.A. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. **Nature**, v. 232, p. 478-480, 1971.
- 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 à Reprodução Animal**.: Livraria Varela, 1 ed, São Paulo, p.195-226, 2001.

- GORDON, M.L. Control of sex ratio in rabbits by eletrophoresis of spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 43, p. 913-918, 1957.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.
- GRISART, B.; MASSIP, A.; COLLETTE, L.; DESSY, F. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. **Theriogenology**, v. 43, p. 1097-1106, 1995.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; LA FUENTE, J. Effect of the in vitro culture system of the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2000.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Determination of the quantity of intact spermatozoa in bull ejaculates. **Archiv Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 38, p. 105-114, 1984.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HANCOCK, J.L.A. Staining technique for the study of temperature-shock in semen, **Nature**, v. 24, p. 323-324, 1951.
- HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. **Theriogenology**, v. 65, p. 119-125, 2006.
- HARRISON, R.A.P.; 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.
- HELLMAN B.; VAGHEF, H.; BOSTRON, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**, v. 326, p. 123-131, 1995.
- HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p. 1295-1308, 1999.
- HOLM, P.; SHUKRI, N.N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Development kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, p. 1285-1299, 1998.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**, 1998 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética) Univesidade de São Paulo (USP)-São Paulo.

- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? In: a XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 346 (supl 1), 2006, Araxá. **Anais...** Araxá: Acta Scientiae Veterinariae, p. 213-224, 2006.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and respond to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 859-975, 2000.
- JEYEDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.
- JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 303-26, 1994.
- JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 93-107, 2000.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; HAMK, H.W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 199-203, 1989.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V.; PINKEL, D. Flow sorting of X and Y chromosome bearing into two populations. **Gamete Research**, v. 16, p. 1-9, 1987.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.
- KANEKO, S.; OSHIO, S.; KOBAYASHI, T.; LIZUKA, R.; MOHRI, H. Human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 124, p. 950-955, 1984.
- KARABINUS, D.; VOGLER C.J.; SAACKE, R.G.; EVERSON, D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 549, 555, 1997.
- KATZ, D.E.; DROBNIS, E.Z. Analysis and interpretation of the forces generated by spermatozoa. In: BAVISTER B.D.; CUMMINS J.; ROLDAN E.R.S. **Fertilization in Mammals**. Norwell, MA. Serono Symposium; 1990: 125-137.

- KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 58-62, 2007.
- KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E.A.; HÄMMERLING, U. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Production National Academy Science**, v. 70, p. 1502-1505, 1973.
- KOSOWER, N.S.; KATAYOSE, H.; YANAGIMACHI, R. Triol-disulfides status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nucleus. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 342-348, 1992.
- LANGERLÖF N. Morphological Studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 19, p. 245-266, 1934.
- LAURINCIK, J.; HYTTEL, P.; BARAN, V.; ECKERT, J.; LUCAS-HAHN, A.; PIVKO, J.; NIEMANN, H.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure, **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 192-199, 1998.
- LONERGAN P.; KOMMISRUUD, E.; ANDRESEN, O.; REFSDAL, A.O.; FARSTAD, W. Use of semen from a bull heterozygous for the 129 translocation in an IVF program. **Theriogenology**, v. 41, p. 1379-1384, 1994.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 259-267, 2003.
- LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.R. In vitro fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393-1405, 1999.
- MANELLA C.A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000.
- MARQUEZ B.; SUAREZ, S.S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 660-667, 2007.
- MARTINS, C.F.; DODE, M.A.N.; BÁO, S.N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 94-104, 2007.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-56, 1996.
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

- McCOSKER, P.J. Abnormal spermatozoa chromatin in infertile bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 363-365, 1969.
- MERTON, J.S.; ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quality in commercial application of embryos technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.
- MOLNAROVA, Z.; MACHATKOVA, M.; MACHAL, A.; HORAKOVA, J.; HANZALOVA, K. A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their in vitro fertilizing ability. **Zygote**, v. 14, p. 63-69, 2006.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.
- NIMMO, M.R.; CROSS, N.L. Structural features of sterols required to inhibit human sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1308-1317, 2002.
- OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 3-10, 2000.
- PAL, S.K.; MANDAL, D.; BHATTACHARYYA, K. Photophysical process of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. **Journal of Physical and Chemical**, v. 102, p. 11017-11023, 1998.
- 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.
- PALMA, G.A.; TORTONESE, D.J.; SINOWATZ, F. Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 30, p. 295-300, 2001.

- PARRILA, I.; VÁZQUEZ, J.M.; CUELLO, C.; GIL, M.A., ROCA, J.; DI BERNARDINO, D. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 128, p. 615-621, 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.
- PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Development kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, p. 105-113, 2001.
- PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS FERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140, 1996.
- PERGORATO, L.M.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Selección del sexo en mamíferos. In: PALMA, G.A. **Biocología de la Reproducción**. 1ed. Inta: Balcarce, 2001. p. 317-351.
- PETERSEN, E.T.; PETROUNKINA, A.M.; HUNDRIESER, M.E. Oocyte-sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 653-662, 2000.
- 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.
- RAO, A.R. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Thesis**. Royal Veterinary College of Stockholm, 1971.
- RISLEY M.S.; EINHEBER, S.; BUMCROT, D.A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. **Chromosoma**, v. 95, p. 217-227, 1986.
- RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 56, p. 503-516, 2001.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimated value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 4, p. 1415-1420, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON B.; PERTROFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.
- SAACKE, R.G.; DALTON J.C.; NADIR, R.L.; NEBEL, J.H.; BAME J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 663-677, 2000.

- SAACKE, R.G.; NADIR, R.L.; NEBEL, J.H. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 41, p. 45-60, 1990.
- SALING P.M.; STOREY, B.T. Mouse gamete interaction during fertilization in vitro. Chortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. **Journal of Cell Biology**, v. 83, p. 544-555, 1979.
- SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIZER, L.N.; SCHENCK, J.L.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86-90, 2004.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. Crypreservation of sorted bovine spermatozoa. **Therionenology**, v. 52, p. 1375-1391, 1999.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299-307, 2005.
- SEGOVIA, M.; JENKINS, J.A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T.R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, v. 53, p. 1489-1499, 2000.
- SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ Cells and Fertilization**, p. 63-101. 1993.
- SEIDEL JR, G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443-446, 2007.
- SEIDEL JR, G.E. Inseminação artificial de bovino com sêmen sexado – Lidando com baixo número de espermatozóides ligeiramente comprometidos. In: a XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 36 (supl 2), 2008, Guarujá. **Anais...** Guarujá: Acta Scientiae Veterinariae, p. 279-286, 2008.
- SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z.; GREEN, R.D. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-1420, 1999.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SIRARD, M.A.; FIRST, NL. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 229-234, 1988.
- SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4-10, 2009.
- SHETTLES, L.B. Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature**, v. 188, p. 918-919, 1960.

- SUAREZ, S.S.; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproduction tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 1-2, 2006.
- SUMMER, A.T.; ROBINSON, J.A. A difference in mass between the heads of X and Y bearing human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48. p. 9-15, 1976.
- SUTOVSKY, P.; OKO, R.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. **Developmental Biology**, v. 188, p. 75-84, 1997.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 127-132, 2002.
- TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497, 1972.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJANETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessment of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 991-998, 1997.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. **Theriogenology**, v. 58, p. 87-102, 2002.
- 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.
- UNANIAN, M.M. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. **Documentos**, 56.
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS FERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assessment of the acrosomal status of membrane intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/Hoechst 33358 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2 ed. New York, 1994, p. 189-317.
- WASSARMAN, P.M.; JOVINE, L.; LITSCHER, E.S. A profile of fertilization in mammals. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 59-63, 2001.

- WHEELER, B.W.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219-227, 2006.
- WILSON, H.R.; WARNICK, A.C.; GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poultry Science**, v. 48, p. 714-717, 1969.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p., 893-901, 2001.
- ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, p. 1657-1663, 2003.

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

Estudos utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo têm demonstrado uma menor fertilidade deste quando comparado ao não sexado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade estrutural e funcional da célula espermática após sexagem por citometria de fluxo. Amostras de sêmen congelado de quatro touros foram utilizadas. Um ejaculado de cada touro foi coletado e fracionado em três partes, sendo: não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). Uma palheta de sêmen foi descongelada sendo uma amostra retirada para avaliação da cinética espermática por sistema computadorizado (CASA – computer-assisted semen analysis), aglutinação de cabeça, alterações morfológicas, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, capacitação espermática e integridade da cromatina. O restante foi depositado em gradiente de *Percoll* de 90:45% (NS90) ou 60:45% (NS60, SX e SY). Após centrifugação em gradiente de *Percoll*, o *pellet* resultante foi homogeneizado, sendo utilizado para avaliação espermática ou PIV. Cada procedimento foi repetido três vezes em manipulações diferentes. Para PIV, 2271 ovócitos maturados *in vitro* foram utilizados, sendo avaliada taxa de fecundação por coloração lacmóide 18 horas pi, clivagem avaliada em D2 (48 hpi) e a taxa de produção de blastocisto avaliada em D6, D7, D8 e D9 de cultivo. Os dados foram analisados usando procedimento GLIMMIX do programa SAS^(R) ($p < 0,05$). Nas características espermáticas avaliadas antes ou após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos SX e SY para todas as variáveis estudadas. As avaliações realizadas antes e após a passagem pelo gradiente de *Percoll* mostraram que o sêmen não sexado apresentou maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana íntegra e células vivas com acrossoma intacto do que o sêmen sexado. Foi observado um efeito do gradiente de *Percoll* nas amostras de sêmen não sexado, sendo que aquelas submetidas ao gradiente de 90:45%

apresentaram maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana intacta e menor taxa de recuperação do que as submetidas ao gradiente de 60:45%. Para taxa de fecundação não foi encontrada diferença entre os grupos. O grupo NS90 apresentou maior taxa de clivagem do que o grupo SY, enquanto que os grupos NS60 e SX foram semelhantes aos demais. A taxa de produção de blastocisto dos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo foi maior no grupo NS90 do que no NS60, SX e SY. Com relação à cinética de desenvolvimento embrionário, não foi observada diferença entre os grupos no estágio do embrião nos dias 6, 7, 8 e 9 pi. Os resultados indicam que o processo de sexagem afeta as características espermáticas, mas não causa diminuição da fertilidade *in vitro*. No entanto, a diferença nas taxas de blastocisto entre os grupos NS60 e NS90 indica que há um efeito do protocolo de seleção espermática na produção de embriões.

Palavra chave: Desenvolvimento embrionário, fecundação, sexo dos embriões, FIV

2 ABSTRACT

Several studies using sex-sorted sperm by flow cytometry have shown that sexed sperm has lower fertility than the non-sexed. Therefore, the objective of the present study was to evaluate structural and functional characteristics of sperm sexed by flow cytometry. In addition, in vitro embryo production and development was assessed when sexed and non-sexed sperm were used for in vitro fertilization. Frozen sexed and non-sexed semen from four different sires were used. One ejaculate from each bull was obtained and was separated into three portions, being non-sexed (NS), sexed for X (SX) and sexed for Y (SY). Frozen-thawed semen from each sample was analyzed for motility by computer-assisted semen analysis (CASA), sperm head agglutination, sperm morphology, plasma membrane integrity, acrosome integrity, capacitation and chromatin integrity. Then, the samples were placed in 90:45% (NS90) or 60:45% (NS60, SX e SY) *Percoll* gradients. After *Percoll* centrifugation, the *pellet* was used for sperm analysis or IVF. All sperm quality tests and IVF experiments were repeated three times in independent replicates. For IVF, 2271 in vitro matured oocytes were used. To assess fertilization rate presumptive zygotes were fixed and stained with lacmoid at 18 hpi. Cleavage was evaluated at D2 (48 hpi) and blastocyst at D6, D7, D8 and D9 of culture. Data were analyzed using proc GLIMMIX of SAS^(R) ($p < 0.05$). No differences were observed between SX and SY groups for any of the sperm variables evaluated either before or after *Percoll* centrifugation. The evaluations performed before and after *Percoll* treatment showed that non-sexed sperm had higher motility, higher percentage of cells with intact membrane and higher percentage of live cells with intact acrosome than sexed sperm. An effect of *Percoll* gradient was observed in the non-sexed samples, with those submitted to 90:45% gradient presenting higher motility, higher percentage of cells with intact membrane and lower recovery rate than those submitted to a 60:45% gradient. No differences among

groups were observed for fertilization rate. NS90 group showed higher cleavage rate than the SY group, while groups NS60 and SX had similar rates to the others. Blastocyst rates at D6, D7, D8 and D9 of culture was greater for group NS90, and similar among NS60, SX and SY groups. Regarding embryo development kinetics, all groups showed similar developmental stages on D6, D7, D8 and D9. The results suggest that although the sex-sorting procedure by flow cytometry affected sperm characteristics, it did not cause a decrease on in vitro fertility. In addition, differences in blastocyst rates between groups NS60 and NS90 indicated an effect of sperm selection protocol on embryo production.

Key-words: Kinetics of development, Fertilization, sex of embryo, IVF.

3 INTRODUÇÃO

Sexagem dos espermatozóides portadores do cromossomo sexual masculino (Y) e do feminino (X) é uma alternativa extremamente interessante, principalmente para a indústria de produção animal. Esse procedimento permite um maior ganho genético, eficiência na produção e maior flexibilidade no manejo do rebanho, bem como o nascimento de fêmeas ou machos, dependendo da demanda do mercado, resultando também em um maior ganho econômico (Rumpf et al., 2000). Estas vantagens têm feito com que o uso de espermatozóides sexados tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, possibilitando uma produção de mais de 4 milhões de palhetas de sêmen em 2008, superando os 2 milhões produzidos em 2007 (Sharpe & Evans, 2009).

Para a sexagem espermática, diversas técnicas foram desenvolvidas a fim de tornar o processo mais eficaz. Tais técnicas foram baseadas em características dos espermatozóides tais como: sensibilidade ao pH (Emmens, 1960), carga elétrica da superfície da membrana (Kaneko et al., 1984), morfologia do núcleo e cabeça (Shettles, 1960), antígenos de superfície (Koo et al., 1973) e diferença no conteúdo de DNA (Johnson et al., 1987; 1989). No entanto, a aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides depende do estabelecimento de uma metodologia que, minimize a perda de espermatozóides durante a sexagem, não reduza o poder fecundante dos mesmos, além de ser compatível com o processo de criopreservação.

Até o presente, somente o procedimento em que a separação é feita por citometria de fluxo tem se mostrado eficaz para uso comercial. Esse método baseia-se na diferença do conteúdo de DNA dos espermatozóides, em que o cromossomo X do bovino contém em torno de 4% a mais de DNA, quando comparado aos espermatozóides com cromossomo Y (Almeida & Álvares, 2003).

Entretanto, com a utilização do sêmen sexado por citometria de fluxo na inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) tem-se alcançado taxas de gestação ou de produção de embriões inferiores quando comparadas às obtidas com sêmen não sexado (Seidel et al., 1999; Sartori et al., 2004; Shenck et al., 2005; Bodmer et al., 2005; Andersson et al., 2006). Esses resultados sugerem que esta técnica pode gerar alguns danos aos espermatozoides, provavelmente devido à exposição ao *laser*, grande pressão na passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e/ou permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes de ser processado (Chastant-Maillard & Druat, 2005).

Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acurácia da sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozoides após a descongelação das doses de sêmen, já que os possíveis danos sofridos pela célula espermática durante o processo de sexagem podem ser responsáveis pela diminuição nos índices de prenhez. No processo de produção *in vitro* de embriões (PIV), apesar de menores índices de produção de blastocistos serem observados quando espermatozoides sexados são utilizados, essa ainda é a técnica mais viável para gerar descendentes com o sexo pré-determinado em bovinos (Faber et al., 2003). Isso porque na PIV é possível utilizar um menor número de espermatozoides para fecundar um grande número de ovócitos, otimizando o uso de uma dose de sêmen sexado que além de apresentar maior porcentagem de células inviáveis, também apresenta menor concentração de células/dose.

Desta forma, mais estudos são necessários para verificação de possíveis alterações causadas na célula espermática durante o processo de sexagem (Dell'Aqua Jr. et al., 2006). Esse conhecimento permitirá estabelecer procedimentos mais adequados para melhorar o aproveitamento e os resultados quando da utilização deste sêmen na produção de embriões.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade estrutural e funcional da célula espermática após sexagem por citometria de fluxo. Além disso, visou avaliar a cinética de desenvolvimento de embriões machos e fêmeas a partir de ovócitos fecundados com espermatozoides sexados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Com exceção daqueles especificamente indicados, todos os demais produtos químicos utilizados foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA).

4.2 Delineamento Experimental

Sêmen congelado de quatro touros da raça Nelore foi utilizado no presente estudo. Para a produção desse material experimental, um ejaculado de cada touro foi coletado, e fracionado em três partes. Uma destas foi congelada (sêmen não sexado – Grupo NS) e as outras duas foram separadas por citometria de fluxo para grupos contendo espermatozóide contendo cromossomo X ou Y (Grupo SX e Grupo SY, respectivamente) e posteriormente congelada. Todo o procedimento foi realizado por empresa comercial (ABS Pecplan, Uberaba, SP, Brasil), sendo o sêmen adquirido desta empresa. O sêmen foi então utilizado para avaliação dos parâmetros espermáticos e PIV, sendo cada procedimento repetido em três diferentes manipulações. Em cada repetição, uma palheta de cada grupo (NS, SX e SY) foi descongelada para avaliação das características espermáticas antes e após passagem pelo gradiente de *Percoll*. Foi feita avaliação da motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA – computer-assisted semen analysis), aglutinação de cabeça,

alterações morfológicas, integridade das membranas plasmática e acrossomal, capacitação espermática e integridade da cromatina. Para PIV, 2271 complexos ovócitos *cummulus* (COCs) foram maturados *in vitro*, sendo realizada a fecundação *in vitro* (FIV) de cada grupo simultaneamente, utilizado um touro por manipulação, em um total de três manipulações por touro. Para controle da PIV, em todas as manipulações realizadas um quinto grupo foi adicionado. Neste, os ovócitos foram fecundados com sêmen de um touro controle (TC) de fertilidade *in vitro* conhecida e utilizado por anos no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como touro referência, sendo que somente manipulações cujo TC apresentou resultado superior a 35% de blastocisto foram utilizadas.

4.3 Avaliação dos Parâmetros Espermáticos

4.3.1 Avaliação da cinética espermática, morfologia e taxa de recuperação

A cinética espermática foi determinada pelo CASA. Para a avaliação da motilidade, dois microlitros de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (Leja[®] standard count, SC20.01.04.B, 20 microns) sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado (*setup*) para análise de sêmen bovino (Anexo A). No mínimo, sete campos foram selecionados para a leitura e análise. Os parâmetros de cinética espermática mensurados foram os seguintes: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$; VAP), velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), amplitude lateral de cabeça (μm ; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF) e linearidade (%; LIN).

A morfologia das células espermáticas foi avaliada em preparação úmida em microscópio de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (Nikon Eclipse E200) de acordo com Barth e Oko (1989). Para esta análise, consideraram-se as anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda. Foi feita contagem de 200 células e os resultados expressos em porcentagem de espermatozóides normais.

Para avaliação de aglutinação de cabeça foi feita preparação úmida, semelhante ao descrito para morfologia espermática. Para esta análise consideraram-se aglutinadas,

cabeças agrupadas em duas ou mais células. Foi feita contagem de 200 células e os resultados expressos em porcentagem.

A concentração espermática também foi determinada no hematocítômetro, na diluição de 1:200. O resultado foi expresso em células espermáticas/mL, sendo os dados utilizados para se obter a taxa de recuperação (quantidade de espermatozoides recuperados após passagem pelo gradiente de *Percoll*), sendo calculada a partir da fórmula: $(\text{Concentração final} \times \text{Volume final}) \times (\text{Concentração inicial} \times \text{Volume inicial})^{-1} \times 100$.

4.3.2 Avaliação da capacitação, integridade de membrana plasmática, do acrossoma e da cromatina

Para avaliação da capacitação foi utilizada técnica de coloração com hidróclorido de clortetraciclina (CTC), modificado de Cormier et al. (1997). Amostra de sêmen (10 μL) foi diluída em uma solução de corante de CTC (15 μL) (Anexo B). Uma alíquota de 10 μL de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. A amostra foi mantida em caixa contendo água para manter a umidade, protegida da luz à temperatura de 4°C por aproximadamente 4 a 5 horas. Foram examinadas 200 células espermáticas em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão). Foram considerados capacitados os espermatozoides que apresentaram ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (Figura 1).

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probe[®], Eugene, Oregon, EUA), conforme descrição de Harrison e Vickers (1990). Uma amostra de sêmen (10 μL) foi adicionada à solução de corante (40 μL) (Anexo C) e incubada por 10 minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10 μL de solução de 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 395/420 nm excitação/emissão). Foram examinadas 200 células espermáticas por lâmina, sendo classificadas de acordo com a membrana espermática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça); membrana semi-lesada (presença de coloração verde e vermelha na cabeça); membrana lesada

(presença de coloração vermelha na cabeça) (Figura 2). Para fins de análise utilizaram-se os percentuais de espermatozóides com membrana íntegra.



Figura 1. Espermatozóide corado com hidróclorido de clortetraciclina (CTC) apresentando ausência ou baixa fluorescência na região pós acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal (padrão capacitado), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 100x.

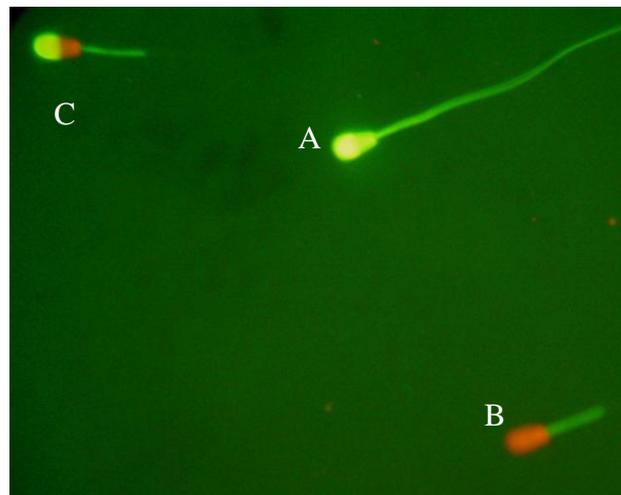


Figura 2. Espermatozóides corados com diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), demonstrando membrana plasmática íntegra (A), membrana plasmática lesada (B) e membrana plasmática semi lesada (C), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40x.

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando uma conjugação de isoticianato de fluotresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut*

agglutinin – PNA) e IP, como descrito por Klinc e Rath (2007). Amostra de sêmen (10 μ L) foi diluída em uma solução de corante (30 mL) (Anexo D) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 10 μ L de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. Foram examinadas 200 células espermáticas em microscópio de contraste de fase e microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão). Os espermatozoides foram classificados em quatro categorias, sendo: morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma) (Figura 3).

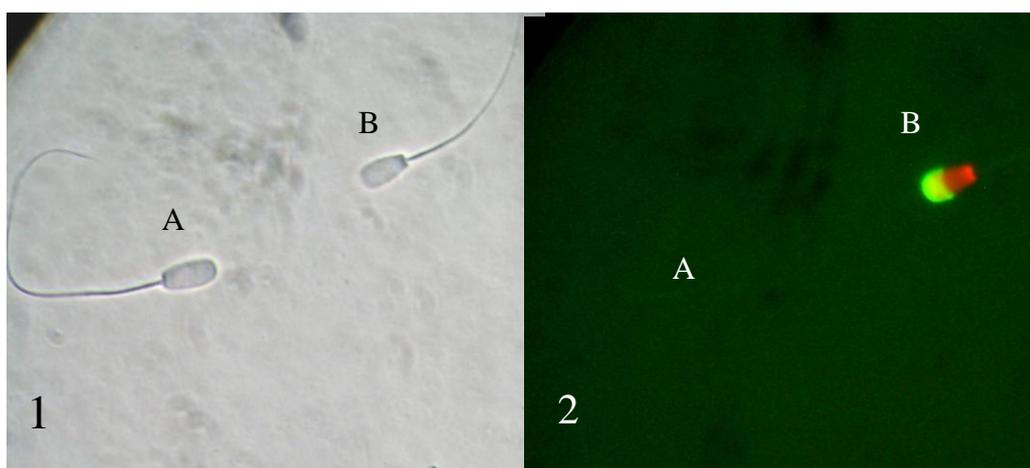


Figura 3. Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozóide vivo com acrossoma íntegro (A) visualizado no contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de isotocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozóide morto com acrossoma reagido (B) visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2) em aumento de 40x.

A integridade de cromatina foi determinada usando coloração com alaranjado de acridine. Dois esfregaços foram preparados para cada amostra, secados em ar e fixados *overnight* em solução fixadora (metanol:ácido acético, 3:1). As lâminas foram secadas em ar e incubadas em solução tampão (80 mmol/L de ácido cítrico e 15 mmol/L de Na₂HPO₄, pH 2,5) a 75°C por 5 minutos. Posteriormente, as

lâminas foram coradas por 5 minutos com solução de alaranjado de acridine (0,2 mg/mL), ácido cítrico (0,1 M) e fosfato di-sódico (0,3M; Anexo E) e analisadas no mesmo dia em microscópio de fluorescência (450/530 nm excitação/emissão, filtro 09). Para todas as amostras, 500 células foram examinadas em cada lâmina, em aumento de 40x. Apenas espermatozóides que fluoresceram de verde foram considerados tendo cromatina normal (Figura 4).

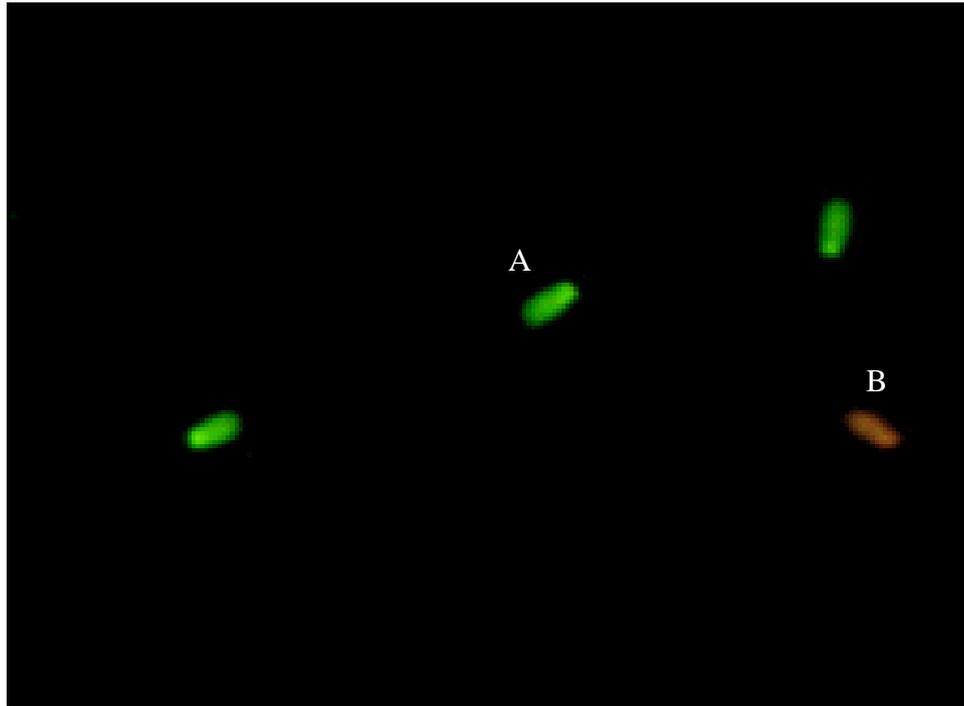


Figura 4. Espermatozóide corado com alaranjado de acridine, demonstrando espermatozóide com cromatina íntegra (A) e cromatina lesada (B), observado em microscópio de epifluorescência em aumento de 40 x.

4.4 Produção de Embriões *In Vitro*

4.4.1 Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro*

Ovários de vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) foram coletados em abatedouro e transportados em solução salina (NaCl 0,9%) aquecida à 35°C, suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50 µg/mL). Os

COCs foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro com escalpe 18 gauge. O líquido folicular aspirado com os COCs foi depositado em tubo cônico de 15 mL. Após a sedimentação, os COCs foram recuperados e selecionados com auxílio de esteriomicroscópio. Somente os COCs que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do *cumulus*, foram utilizados. Os COCs selecionados foram lavados e transferidos, em número de 25 a 30, para uma gota de 200 µL de meio de maturação sob óleo de silicone e incubados por 22 horas a 39°C em 5% de CO₂ em ar.

O meio de maturação consistiu em TCM 199 sais de Earl (Gibco BRL[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina e 50 µg/mL de estreptomicina.

4.4.2 Seleção espermática

O sêmen de cada touro foi descongelado a 37°C por 30 segundos em banho-maria e as células espermáticas selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* 45 e 90% (grupo NS90 e TC) ou 45 e 60% (grupo NS60, SX e SY).

Para o grupo NS90 e TC, foi utilizado o protocolo descrito por Marinheiro et al. (2009). As 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 microtubos de 2 mL e centrifugados a 5.400 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet centrifugado por 5 minutos em SP-TALP a 5.400 g. O pellet resultante foi ressuscitado com meio de fecundação (FEC) para avaliação espermática ou FIV.

Para os grupos NS60, SX e SY, foi utilizado protocolo de preparação espermática para sêmen sexado, de acordo com Blondin et al. (2009) com modificações. Para isto as amostras de sêmen foram colocadas sobre gradiente de *Percoll*, constituído de 400 µL de *Percoll* 45% e 400 µL de *Percoll* 60%, colocados em microtubo para centrífuga (1,7 mL), sendo centrifugados a 700 g por 5 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* centrifugado por 2 minutos em 500 µL de meio FEC a 200 g. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* resultante foi homogeneizado, sendo utilizado para avaliação espermática ou FIV.

O meio de fecundação utilizado foi o TALP (Parrish et al., 1995), suplementado com 2 mM de penicilina G sódica, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina.

4.4.3 Fecundação *in vitro* e cultivo de embriões

Os ovócitos maturados foram transferidos para gotas de 50 µL (NS60, SX e SY) ou 200 µL (NS90 e TC) de meio FEC. Após a centrifugação no gradiente de *Percoll*, foi realizada a contagem dos espermatozóides no hematocítmetro, sendo que a concentração final na gota de fecundação foi de 1×10^6 espermatozóides/mL. Espermatozóides e ovócitos foram co-incubados por 18 horas a 39°C em 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o dia zero (D0).

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram transferidos para gotas de 200 µL de meio de fluido de oviduto sintético (SOF), e cultivados a 39°C em 5% de CO₂ em ar por 9 dias. Os embriões foram avaliados no D2 (48 horas) pós-inseminação (pi) quanto à clivagem e D6, D7, D8 e D9 pi para determinação da cinética de desenvolvimento.

Para cultivo *in vitro* foi utilizado meio SOF suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci) (Holm et al., 1998).

4.5 Avaliação da Taxa de Fecundação e do Estágio de Desenvolvimento Embrionário

Para avaliação da taxa de fecundação dos prováveis zigotos foi utilizada a coloração com lacmóide. Para isto, 18 horas pi, aproximadamente cinco estruturas de cada gota/grupo foram retiradas e transferidas para uma gota de 200 µL de PBS, totalizando 294 estruturas, sendo aproximadamente 73 por grupo. Os prováveis zigotos foram completamente desnudados e fixados em solução de etanol e ácido acético glacial (3:1) por pelo menos 24 horas. Após a fixação, os prováveis zigotos foram lavados e corados com solução de lacmóide 1% em ácido acético glacial 45% (Anexo F). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (Nikon Eclipse E200), sendo classificados em: a) não fecundados (presença de cromatina feminina e ausência de

cromatina masculina); b) fecundados (presença de cromatina feminina e de espermatozóide no citoplasma, cabeça descondensada, pró-núcleo ou clivado); c) fecundado com polispermia (presença de cromatina feminina e duas ou mais cabeças descondensadas e/ou pró-núcleos).

A cinética de desenvolvimento embrionário de cada grupo foi referenciada dando uma nota para cada estágio de blastocisto, sendo posteriormente feita uma média para cada dia de desenvolvimento embrionário (dias 6, 7, 8 e 9), por grupo (NS90, NS60, SX e SY), sendo: 5 blastocisto inicial; 6 blastocisto; 7 blastocisto expandido e 8 blastocisto eclodido, similar ao utilizado por Souza et al. (2007).

4.6 Análise Estatística

Para a análise estatística das variáveis relacionadas às avaliações espermáticas antes e após o Percoll, utilizando uma estrutura de medidas repetidas com sujeito definido como touro*tratamento, as taxas de clivagem e blastocistos em relação aos números totais de ovócitos e clivados, foi utilizado um modelo matemático que incluiu os efeitos fixos de touro, tratamento e fase. Na análise estatística utilizou-se o procedimento GLIMMIX (análise de variância) do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados considerando para as variáveis de proporção uma distribuição binomial e para as de contagem uma Poisson, com funções de ligação logit e logarítmica respectivamente, de acordo com Nelder e Wedderburn (1972).

A estrutura de correlações entre as medidas repetidas foi modelada com a matriz de correlação auto-regressiva de primeira ordem e as comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos com uma aproximação do teste de qui-quadrado.

Adicionalmente, obtiveram-se as correlações (método de Pearson) das características espermáticas com a taxa de blastocisto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

As características da célula espermática para os diferentes grupos antes e após a seleção pelo *Percoll* são apresentados na Tabela 1 e 2. Nas características avaliadas antes ou após a passagem pelo *Percoll*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos SX e SY para todas as variáveis estudadas. As avaliações realizadas após a descongelamento, antes da passagem pelo *Percoll*, mostraram que o sêmen não sexado apresentou maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana íntegra e células vivas com acrossoma intacto do que o sêmen sexado.

Após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, o grupo NS (90 e 60) apresentou maior motilidade, motilidade progressiva, porcentagem de células com membrana íntegra e de células vivas com acrossoma intacto do que os grupos sexados X e Y. Foi observado um efeito do gradiente de *Percoll* nas amostras de sêmen não sexado, sendo que as amostras submetidas ao gradiente de 90:45% apresentaram maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana intacta e menor taxa de recuperação do que as submetidas ao gradiente de 60:45% (Tabela 2). Para avaliação da taxa de recuperação, a concentração das amostras também foi avaliada, sendo que o número de espermatozoides por palheta foi maior no sêmen não sexado ($35,0 \pm 2,7 \times 10^6$) do que no sêmen contendo espermatozoide sexado X ($2,4 \pm 0,8 \times 10^6$) ou Y ($2,2 \pm 0,4 \times 10^6$).

Tabela 1. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva, morfologicamente normais, com cabeça aglutinada, com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegros, de sêmen não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) antes da passagem pelo gradiente de *Percoll*.

Grupo	N	Motilidade	Motilidade progressiva	Espermatozóides normais	Cabeça aglutinada	Membrana íntegra	Vivo com acrossoma íntegro	Cromatina íntegra
NS	12	58,0 \pm 3,0 ^a	8,3 \pm 1,2	89,6 \pm 0,8	2,6 \pm 0,4	58,2 \pm 3,0 ^a	60,9 \pm 3,3 ^a	98,7 \pm 0,1
SX	12	29,6 \pm 1,3 ^b	9,3 \pm 0,9	91,2 \pm 0,7	1,4 \pm 0,3	36,0 \pm 2,9 ^b	37,1 \pm 3,3 ^b	98,6 \pm 0,1
SY	12	26,2 \pm 2,1 ^b	6,8 \pm 1,1	88,9 \pm 0,8	0,8 \pm 0,2	36,4 \pm 2,9 ^b	37,5 \pm 3,3 ^b	99,5 \pm 0,1

^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 2. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozóides móveis, com motilidade progressiva, morfologicamente normais, com cabeça aglutinada, capacitados, com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegros, de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) após passagem pelo gradiente de *Percoll*.

Grupo	N	Motilidade	Motilidade progressiva	Espermatozóides normais	Cabeça aglutinada	Capacitado	Membrana íntegra	Vivo com acrossoma íntegro	Cromatina íntegra	Taxa de recuperação
NS90	12	81,9 \pm 3,2 ^a	40,2 \pm 3,5 ^a	95,2 \pm 0,6	25,7 \pm 4,6	33,1 \pm 13,7	77,9 \pm 2,5 ^a	66,0 \pm 3,2 ^a	98,8 \pm 0,1	28,3 \pm 2,1 ^a
NS60	12	70,4 \pm 2,9 ^b	38,5 \pm 3,0 ^a	92,8 \pm 0,7	22,6 \pm 2,9	30,5 \pm 13,4	65,9 \pm 2,9 ^b	61,0 \pm 3,3 ^a	98,7 \pm 0,1	47,9 \pm 4,0 ^b
SX	12	37,1 \pm 4,0 ^c	10,3 \pm 2,4 ^b	94,9 \pm 0,6	27,2 \pm 2,5	34,7 \pm 13,8	39,6 \pm 3,0 ^c	37,8 \pm 3,3 ^b	98,7 \pm 0,1	52,7 \pm 3,9 ^b
SY	12	43,4 \pm 3,2 ^c	13,2 \pm 1,4 ^b	93,5 \pm 0,7	25,1 \pm 2,5	32,4 \pm 13,6	41,3 \pm 3,0 ^c	40,4 \pm 3,3 ^b	98,5 \pm 0,1	48,7 \pm 4,3 ^b

^{a,b,c}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

A comparação das características das células espermáticas avaliadas antes e após a seleção pelo *Percoll* para os diferentes grupos é apresentada na Figuras 5. A passagem pelo gradiente de *Percoll* não afetou a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e com cromatina íntegra. Já para os parâmetros de motilidade e cabeça aglutinada, foi observado um aumento após seleção pelo *Percoll* em todos os grupos estudados. Com relação à motilidade progressiva, apenas o sêmen contendo espermatozóide sexado X não apresentou diferença após a passagem pelo *Percoll*. Foi observado um aumento para a porcentagem de células com membrana íntegra, após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, independente do protocolo utilizado. Quando o sêmen não sexado foi avaliado, a porcentagem de células vivas com acrossoma íntegro, só apresentou um aumento quando a amostra foi submetida ao gradiente de *Percoll* de 90:45%.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os parâmetros de movimento espermático fornecidos pelo sistema CASA, para os diferentes grupos antes ou após a seleção pelos gradientes de *Percoll*. Na avaliação antes (Tabela 3) ou após (Tabela 4) a passagem pelo *Percoll*, nenhuma diferença foi observada entre os grupos SX e SY para todas as variáveis estudadas. No entanto, o grupo NS apresentou maiores valores de VCL, BCF e LIN do que os grupos SX e SY. O sêmen contendo espermatozóide sexado Y apresentou VSL semelhante ao grupo NS e SX, sendo o SX superior ao NS.

Após passagem pelo gradiente de *Percoll*, o sêmen não sexado apresentou valores semelhantes de VAP, VSL e LIN, independente do gradiente utilizado, sendo esses valores superiores aos observados para os grupos sexados X e Y.

A seleção pelo gradiente de *Percoll* não afetou nenhuma das características avaliadas pelo sistema CASA no sêmen sexado (Figura 6). Entretanto, um aumento nos valores de VAP, VSL, BCF e LIN e uma diminuição em VCL foram observados quando sêmen não sexado foi utilizado, independente do gradiente de *Percoll*.

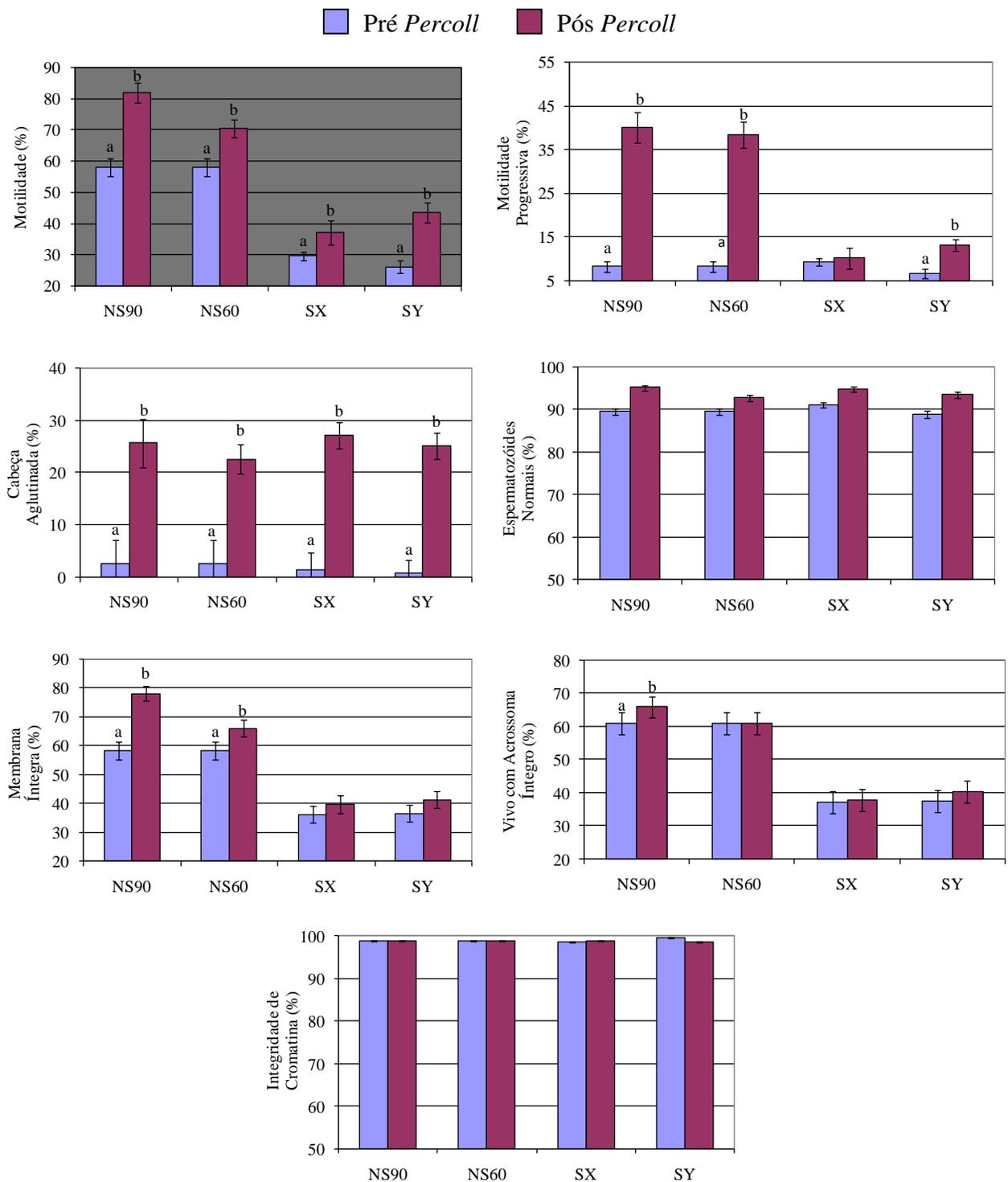


Figura 5. Proporção (média dos quadrados mínimos \pm EP) de espermatozoides móveis, com motilidade progressiva, morfologicamente normais, com cabeça aglutinada e com membrana plasmática, acrossomal e cromatina íntegras, antes e após passagem pelo gradiente de *Percoll* de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes (NS90 e NS60), contendo espermatozoides sexado X (SX) e Y (SY). ^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna de cada grupo, diferem ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA para de sêmen não sexado (NS), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) antes da passagem pelo gradiente de *Percoll*.

Grupo	N	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)
NS	12	45,7 \pm 1,1	30,3 \pm 1,0 ^a	6,5 \pm 0,2 ^a	5,7 \pm 0,8	23,3 \pm 0,9 ^a	38,7 \pm 1,4 ^a
SX	12	44,9 \pm 1,2	35,0 \pm 1,0 ^b	4,6 \pm 0,2 ^b	5,6 \pm 0,8	28,5 \pm 0,9 ^b	44,3 \pm 1,4 ^b
SY	12	41,9 \pm 1,3	32,8 \pm 1,0 ^{a,b}	4,7 \pm 0,2 ^b	5,6 \pm 0,8	27,5 \pm 0,9 ^b	42,5 \pm 1,4 ^b

VAP – velocidade de trajeto

VSL – velocidade retilinea

VCL – velocidade curvilinea

ALH – amplitude lateral de cabeça

BCF – frequência de batimentos

LIN - linearidade

^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY) após passagem pelo gradiente de *Percoll*.

Grupo	N	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)
NS90	12	61,6 \pm 1,0 ^a	61,6 \pm 1,0 ^a	4,4 \pm 0,2	4,6 \pm 0,8	35,0 \pm 0,9 ^a	52,9 \pm 1,4 ^a
NS60	12	59,5 \pm 1,1 ^a	59,5 \pm 1,0 ^a	4,5 \pm 0,2	4,4 \pm 0,8	33,3 \pm 0,9 ^{a,b}	50,3 \pm 1,4 ^a
SX	12	41,1 \pm 1,2 ^b	41,1 \pm 1,0 ^b	4,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,8	32,1 \pm 0,9 ^b	45,0 \pm 1,4 ^b
SY	12	43,8 \pm 1,3 ^b	43,8 \pm 1,0 ^b	4,7 \pm 0,2	4,6 \pm 0,8	30,9 \pm 0,9 ^b	42,2 \pm 1,4 ^b

VAP – velocidade de trajeto

VSL – velocidade retilinea

VCL – velocidade curvilinea

ALH – amplitude lateral de cabeça

BCF – frequência de batimentos

LIN - linearidade

^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

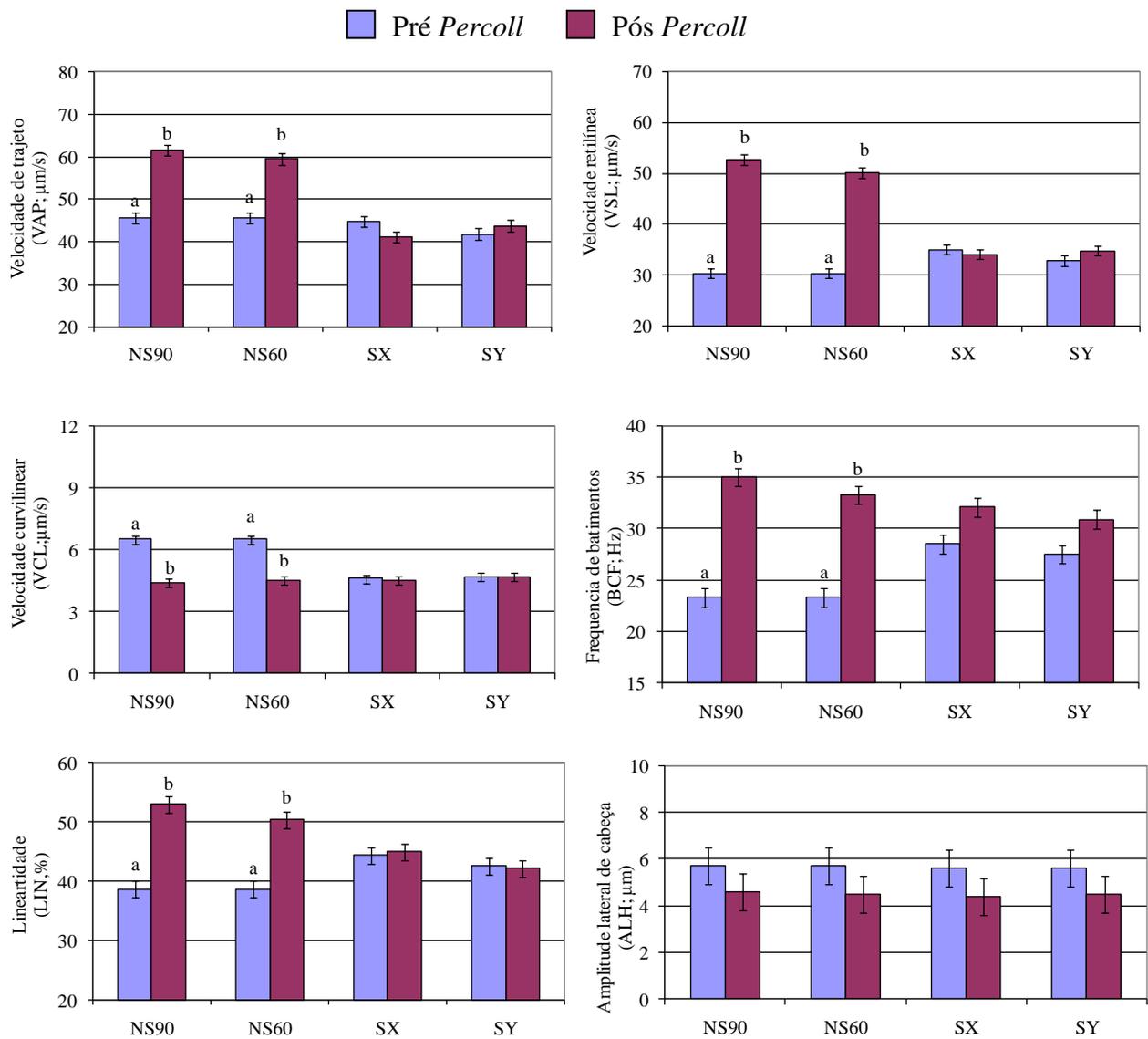


Figura 6. Valores (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cinética espermática fornecidos pelo sistema CASA antes e após passagem pelo gradiente de *Percoll* de sêmen não sexado em dois diferentes gradientes (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY).^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna de cada grupo, diferem significativamente ($p < 0,05$).

Para avaliar a taxa de fecundação, 294 possíveis zigotos foram utilizados, não havendo diferença entre os grupos para essa variável (Figura 7). Quanto à avaliação dos fecundados, constatou-se que a maioria dos zigotos apresentava a cromatina masculina em estágio de pró núcleo às 18 horas pi, não sendo observada diferença entre os grupos para qualquer um dos estágios encontrados (Figura 8).

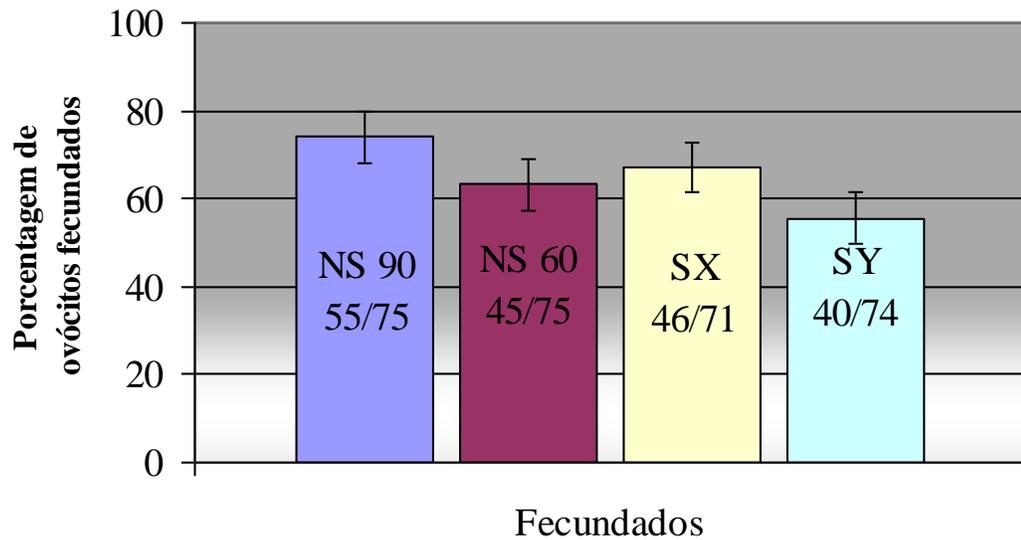


Figura 7. Porcentagem (média dos quadrados mínimos \pm EP) de ovócitos fecundados 18 horas pi utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY), não sendo encontrada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos (ovócitos fecundados/ovócitos inseminados).

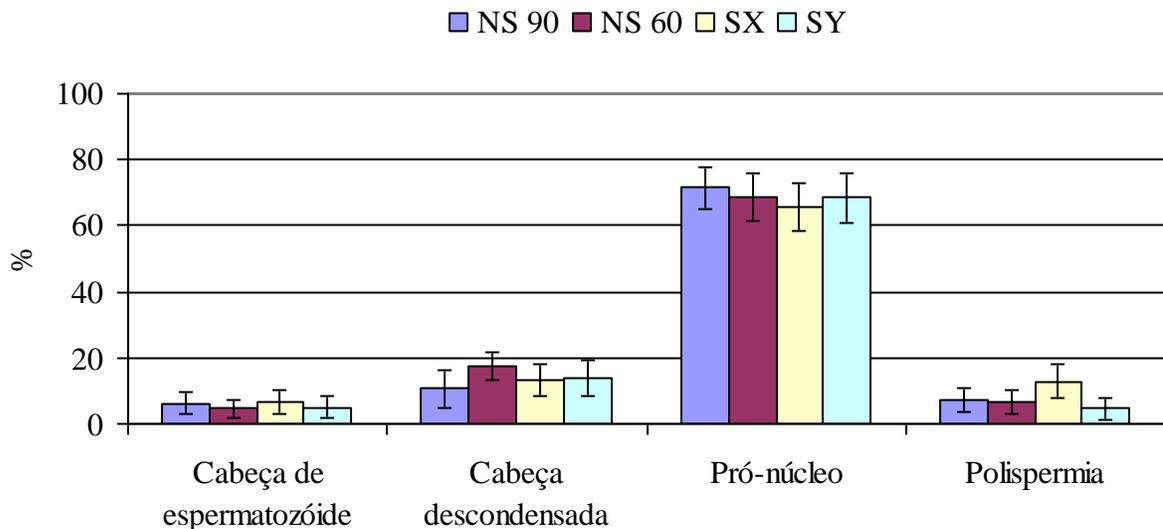


Figura 8. Distribuição (média dos quadrados mínimos \pm EP) da cromatina masculina em zigotos 18 horas pi, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY), não sendo encontrada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos para qualquer estágio da cromatina masculina.

O grupo não sexado submetido ao gradiente de *Percoll* 90:45%, apresentou maior taxa de clivagem do que o grupo SY, enquanto que os grupos não sexado submetido ao ao gradiente de *Percoll* 60:45% e SX foram semelhantes aos demais (Tabela 5). A taxa de blastocisto dos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo foi maior no grupo NS90 do que no NS60, SX e SY. A mesma diferença foi observada quando a taxa de blastocisto em relação ao número de ovócitos clivados foi avaliada (Tabela 6). Na PIV realizada simultaneamente aos tratamentos, utilizando o touro controle do laboratório, a média \pm EP da taxa de clivagem foi de $80,3 \pm 4,1$ e a da taxa de produção de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo foi de $18,5 \pm 3,2$, $38,8 \pm 3,9$, $43,7 \pm 4,0$ e $44,5 \pm 4,1$, respectivamente (Anexo G).

Tabela 5. Taxa de clivagem e produção de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo em relação número total de ovócitos (média dos quadrados mínimos \pm EP), pós fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X(SX) e Y(SY).

Grupo	Ovócitos	Clivagem	D6	D7	D8	D9
NS90	549	$59,6 \pm 3,8^a$	$11,7 \pm 2,3^a$	$29,1 \pm 3,4^a$	$34,9 \pm 3,6^a$	$35,1 \pm 3,6^a$
NS60	516	$53,6 \pm 3,6^{a,b}$	$5,9 \pm 1,7^b$	$19,3 \pm 3,0^b$	$22,2 \pm 3,2^b$	$23,1 \pm 3,2^b$
SX	431	$52,4 \pm 4,2^{a,b}$	$5,5 \pm 1,8^b$	$16,4 \pm 3,1^b$	$18,1 \pm 3,3^b$	$20,3 \pm 3,3^b$
SY	481	$45,0 \pm 4,0^b$	$3,4 \pm 1,4^b$	$12,0 \pm 2,6^b$	$14,8 \pm 2,9^b$	$15,9 \pm 3,4^b$

^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Tabela 6. Taxa de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo em relação ao número de ovócitos clivados (média dos quadrados mínimos \pm EP), pós fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X(SX) e Y(SY).

Grupo	Ovócitos	D6	D7	D8	D9
NS90	331	$19,3 \pm 3,7^a$	$49,3 \pm 4,9^a$	$57,6 \pm 4,9^a$	$59,7 \pm 4,9^a$
NS60	281	$10,7 \pm 3,0^b$	$35,9 \pm 5,1^b$	$41,7 \pm 5,3^b$	$43,5 \pm 5,3^b$
SX	228	$10,6 \pm 3,5^b$	$31,9 \pm 5,5^b$	$35,3 \pm 5,6^b$	$39,7 \pm 5,8^b$
SY	215	$7,5 \pm 3,1^b$	$26,6 \pm 5,4^b$	$32,9 \pm 5,8^b$	$35,4 \pm 5,9^b$

^{a,b}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Com relação à cinética de desenvolvimento embrionário, não foi observada diferença entre os grupos no estágio do embrião nos dias 6, 7, 8 e 9 pi (Figura 9).

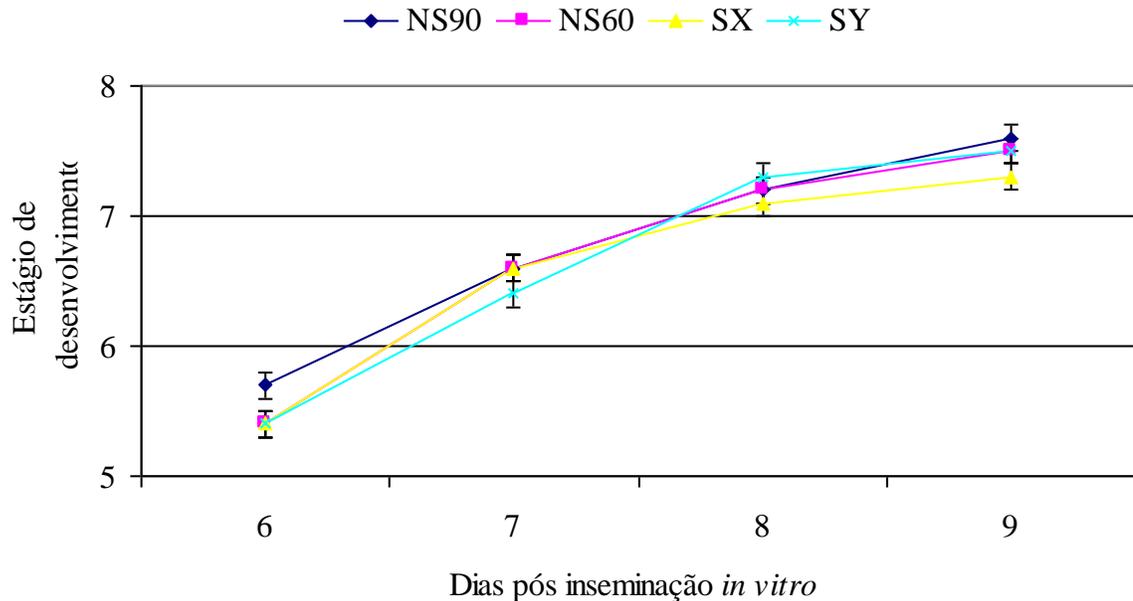


Figura 9. Distribuição (média dos quadrados mínimos \pm EP) do estágio de desenvolvimento embrionário utilizando sêmen não sexado em dois diferentes gradientes de *Percoll* (NS90 e NS60), contendo espermatozóide sexado X (SX) e Y (SY). Sendo: 5 = Blastocisto inicial; 6 = Blastocisto; 7 = Blastocisto expandido; e 8 = Blastocisto eclodido.

Na tabela 7 estão apresentadas as correlações de Pearson das variáveis espermáticas após passagem pelo gradiente de *Percoll* e a taxa de blastocisto em D8 em relação ao número de ovócitos fecundados. Foi observada correlação positiva e significativa para motilidade, motilidade progressiva, membrana íntegra e os valores de VAP, VSL e LIN avaliados pelo sistema CASA. No entanto, todas as correlações encontradas foram de média intensidade, com amplitude entre 0,48 e 0,53.

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre diferentes variáveis espermáticas após passagem pelo gradiente de *Percoll* e taxa de produção de blastocisto em D8

Variáveis correlacionadas com taxa de blastocisto	r	P
Motilidade	0,51	0,04
Motilidade progressiva	0,53	0,03
Espermatozóides normais	-0,17	0,5
Membrana íntegra	0,47	0,05
Vivo com acrossoma íntegro	-0,06	0,8
Cromatina íntegra	0,34	0,19
Velocidade de trajeto (VAP)	0,48	0,05
Velocidade retilínea (VSL)	0,49	0,05
Velocidade curvilínea (VCL)	0,36	0,16
Amplitude lateral de cabeça (ALH)	0,04	0,87
Frequência de batimento (BCF)	0,34	0,19
Linearidade (LIN)	0,48	0,05

5.2 Discussão

O sêmen sexado vem sendo amplamente utilizado como método de determinação do sexo dos descendentes, e seu uso associado à PIV apresenta-se atualmente como uma das mais vantajosas associações entre biotécnicas (Faber et al., 2003). No entanto, muitos estudos relatam uma menor fertilidade do sêmen sexado em relação ao não sexado tanto *in vivo* como *in vitro* (Seidel et al., 1999; Lu et al., 1999; Sartori et al., 2004; Bodmer et al., 2005; Andersson et al., 2006; Bermejo-Álvarez et al., 2008; Seidel & Schenk, 2008). Desta forma, o presente estudo, objetivou avaliar a viabilidade estrutural e funcional do sêmen bovino sexado por citometria de fluxo.

Após a descongelção, a proporção de espermatozóides móveis, com membrana íntegra e vivos com acrossoma íntegro foi menor para o sêmen sexado quando comparado ao não sexado. Estes resultados já eram esperados, considerando que uma menor fertilidade do sêmen

após sexagem por citometria de fluxo tem sido relatada por diversos autores, tanto *in vivo* (Sartori et al., 2004; Shenk et al., 2005; Andersson et al., 2006), como *in vitro* (Lu et al., 1999; Wilson et al., 2006; Morton et al., 2007; Bermejo-Álvarez et al., 2008).

A queda na motilidade observada no sêmen sexado pode ser causada, por exemplo, pela exposição ao corante Hoechst 33342, devido à sua toxicidade como já demonstrado em espermatozóide humano (Watkins et al., 1996) e bovino (Hollinshead et al., 2004). É importante ressaltar que, uma vez ligado ao DNA, o corante permanece por longo período incorporado ao mesmo, o que poderia agravar a sua toxicidade. Isto foi constatado neste estudo, uma vez que ao se fazer as avaliações espermáticas em microscópio de fluorescência, foi observado que os espermatozóides sexados ainda apresentavam-se corados com Hoechst, mesmo após serem descongelados, lavados e submetidos a passagem pelo gradiente de *Percoll*. Além disso, o efeito da exposição ao corante e posteriormente ao *laser* pode diminuir a atividade mitocondrial, o que foi demonstrado em ovócitos bovinos (Smith, 1993). Esse tipo de dano também poderia explicar a queda da motilidade observada nos espermatozóides sexados, uma vez que a função das mitocôndrias é produzir ATP como fonte de energia metabólica para o movimento das células espermáticas (Manella, 2000).

Outra característica física afetada pelo processo da sexagem foi integridade da membrana. Essa alteração pode ser devido ao estresse mecânico sofrido pelo espermatozóide (Garner, 2006), visto que já foi demonstrado que uma diminuição da pressão durante o processo de sexagem aumentou a sobrevivência de espermatozóides sexados e, conseqüentemente a taxa de fecundação (Suh et al., 2005) e de gestação (Schenk et al., 2009). No entanto, apesar da menor pressão minimizar os danos no espermatozóide, ela pode comprometer a acurácia da sexagem, sendo que em algumas espécies torna a célula incapaz de se orientar corretamente no aparelho (Garner, 2006).

O presente estudo também detectou uma menor porcentagem de células vivas com acrossoma intacto nas amostras de sêmen sexadas, provavelmente devido aos mesmos fatores responsáveis pela diminuição de motilidade e da integridade da membrana. Uma maior (Mocé et al., 2006) ou igual (Klinc et al., 2007; Blondin et al., 2009) porcentagem de células com acrossoma reagido no sêmen sexado que no não sexado também foram observadas. Essa variação nos resultados sugere que pode existir uma sensibilidade individual de touro ao processo de sexagem. Além disso, a técnica utilizada para identificação do acrossoma nos diferentes

trabalhos, também pode influenciar a porcentagem de detecção da reação acrossomal (Carvalho et al., 2008).

É importante ressaltar que os danos aos espermatozoides podem não ser devido diretamente ao processo de sexagem, mas sim também ao processo de congelação, de forma que a sexagem apenas tornaria os espermatozoides mais sensíveis a futuras injúrias. Isto foi demonstrado por diversos trabalhos avaliando sêmen sexado fresco e criopreservado, sendo que o processo de congelação, e não a sexagem gerou danos à membrana do espermatozoide (Mocé et al., 2006; Blondim et al., 2009).

Apesar dos resultados com relação ao efeito da sexagem na integridade da cromatina serem controversos (Boe-Hanson et al., 2005; Blondin et al., 2009) o presente estudo mostrou não haver diferença nessa característica entre o sêmen sexado e o não sexado. Tem sido demonstrado que espermatozoides submetidos à irradiação por UV não perdem a capacidade de fecundar, mas que a capacidade funcional da cromatina é afetada (Bordignon & Smith, 1999). Portanto, resultados encontrados em nosso trabalho, em que o processo de sexagem não induziu alteração na cromatina, foi inesperado. É comprovado que a maior estabilidade da cromatina do espermatozoide bovino, seja devido principalmente a uma maior proporção de protaminas e de apenas um tipo comparado a outros mamíferos que possuem menor proporção e dois tipos de protaminas (Beletti et al., 2005), seja responsável pela resistência à UV. Além disso, a técnica utilizada nesse estudo para avaliar as alterações da cromatina pode não ter sido a mais indicada, considerando que essa detecta menos problemas de alteração de DNA do que, por exemplo, a técnica de TUNEL (Martins et al., 2007).

O objetivo desse estudo além de avaliar o efeito do processo de sexagem nas características físicas de espermatozoides bovinos, foi também avaliar o seu efeito nas características funcionais utilizando a PIV como ferramenta. Portanto, para essa avaliação o sêmen foi submetido aos procedimentos já estabelecidos para essa biotécnica. Já que o sêmen utilizado para fecundar ovócitos é previamente selecionado, na maioria dos laboratórios, através da passagem por um gradiente de *Percoll*, a avaliação das características espermáticas após essa seleção, foi também realizada.

As diferenças entre sêmen sexado e não sexado observadas após a descongelação foram mantidas após a passagem pelo gradiente de *Percoll*. Sendo que ao se comparar as avaliações antes e após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, os efeitos mais marcantes em todos

os grupos foram na motilidade e na percentagem de cabeça aglutinada. O efeito do gradiente de *Percoll* na seleção de espermatozóides com melhora na porcentagem de espermatozóides móveis em uma amostra de sêmen tem sido relatado por vários autores (Parrish et al., 1995; Tanghe et al., 2002; Trentalance & Beorlegui, 2002; Cesari et al., 2006; Alomar et al., 2008; Marinheiro et al., 2009). A aglutinação de cabeça, por sua vez, está relacionada à capacitação espermática, que poderia ser induzida pela passagem pelo gradiente de *Percoll* (Trentalance & Beorlegui, 2002; Cesari et al., 2006). O grande aumento de cabeça aglutinada encontrada em todos os grupos após o gradiente de *Percoll* sugere este efeito. No entanto, isto não pode ser confirmado no presente estudo, pois a presença do diluente e crioprotetores impedem a realização da técnica de CTC, antes da passagem pelo gradiente *Percoll*. Também tem sido sugerido que a capacitação pode ser induzida pelo processo de sexagem (Maxwell et al., 1997), o que também não foi identificado neste estudo, já que a porcentagem de células capacitadas foi semelhante em todos os grupos avaliados. Apesar disso, esse efeito não pode ser excluído, já que neste estudo a reação do acrossoma, que é a etapa final dos múltiplos eventos que ocorrem na capacitação (Blondin et al., 2009), foi afetada pela sexagem, sendo a porcentagem de espermatozóides vivos com membrana e acrossoma íntegros maior no sêmen não sexado do que sexado. A capacitação, assim como as outras características avaliadas, tem sido amplamente estudada por diversos autores (Thundathil et al., 1999; Trentalance e Beorlegui, 2002; Gillan et al., 2008; Mocé & Grahan, 2008) na tentativa de correlacioná-la com a taxa de fecundação e de blastocisto, sendo os resultados muito variáveis.

Puglisi et al. (2004) relatam que a capacitação está relacionada com a habilidade do espermatozóide de se ligar à zona pelúcida e a velocidade de penetração do espermatozóide no ovócito. Essa afirmativa foi comprovada em nosso estudo, em que a porcentagem de espermatozóides capacitados, o estágio de descondensação da cromatina e porcentagem de ovócitos fecundados 18 horas pi não diferiu entre os grupos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Lu et al. (2004) e Morton et al. (2007), sugerindo que a penetração do espermatozóide no ovócito não é afetada pelo processo de sexagem.

Apesar da taxa de fecundação ter sido semelhante, a produção de blastocisto do grupo não sexado submetido ao gradiente de *Percoll* 90:45% foi superior a todos os outros. Nenhum efeito do processo de sexagem foi observado também na taxa de clivagem e blastocisto considerando o sêmen não sexado submetido ao gradiente *Percoll* 60:45% como nosso controle.

A maior taxa de blastocisto no grupo NS90 pode ter sido devido a uma melhor seleção, que resultou em maior porcentagem de células móveis e com membrana íntegra. Curiosamente, esse fato não afetou a fecundação, mas sim o desenvolvimento embrionário posterior. Entretanto, esse mesmo efeito não foi observado no grupo NS60 em relação ao SX e SY, que apesar de apresentar maior motilidade e mais células com membrana íntegra não mostrou diferença na taxa de blastocisto.

A partir destes resultados, questiona-se se o uso do sêmen sexado selecionado em gradiente de *Percoll* de 90:45% apresentaria uma melhor produção de embriões do que em gradiente de *Percoll* de 60:45%, ou se diferenças entre o sexado e o não sexado seriam detectadas. Para responder a essa questão, sêmen sexado e não sexado de um mesmo ejaculado deveriam ser comparados utilizando os diferentes protocolos de gradiente *Percoll*. Esse tipo de informação é inexistente na literatura. Os estudos que comparam sêmen sexado, em geral, utilizam o protocolo de rotina do gradiente *Percoll* (90:45%) (Wilson et al., 2006; Morton et al., 2007; Bermejo-Álvarez et al., 2008) ou quando usam um protocolo diferenciado para o sêmen sexado (60:45%), esse também é utilizado no grupo controle (Blondin et al., 2009). Além disso, alguns trabalhos usam como controle sêmen não sexado de touros diferentes ou de partidas diferentes (Palma et al., 2008), o que também pode comprometer o resultado. Em contraste, as amostras utilizadas no presente trabalho foram todas processadas dos mesmos ejaculados, o que torna esse resultado diferenciado em relação a outros estudos. Há evidências demonstrando a importância de se comparar diferentes protocolos de preparação espermática e estabelecer o mais adequado para PIV utilizando sêmen sexado, que garanta as melhores taxas de blastocisto.

Devido ao grande número de doses necessárias e ao alto custo que representa não foi realizada a comparação entre sêmen sexado e não sexado utilizando os dois protocolos de gradiente *Percoll*. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados para utilização do sêmen sexado em gradiente de *Percoll* de 90:45% na busca de uma melhor produção de embriões. Uma dose que contém menor concentração espermática com menor motilidade e padrão de movimento pós-descongelamento diferentes de uma dose de sêmen não sexado, quando submetida a uma seleção mais rigorosa resultaria em uma menor taxa de recuperação limitando o uso dessa dose para um pequeno número de ovócitos. Isto poderia ser resolvido descongelando mais doses de sêmen sexado em cada manipulação. No entanto, o elevado custo da dose de sêmen sexado

acarretaria em um aumento significativo do custo de produção, o que poderia inviabilizar o processo, mesmo que uma maior porcentagem de embriões fosse alcançada.

A porcentagem de células móveis e com membrana íntegra juntamente com motilidade progressiva e alguns parâmetros avaliados pelo sistema CASA, tiveram correlação de média intensidade com a taxa de blastocisto, sendo o grupo NS90 o que apresentou melhores valores para estas características, tendo também a maior taxa de blastocisto. Entretanto, não foi possível explicar a correlação das características espermáticas afetadas pela sexagem com a taxa de produção de embrião quando o gradiente *Percoll* 60:45% foi utilizado. Nesse caso, o grupo NS60 apresentou valores superiores em relação ao grupo SX e SY para as características espermáticas que tiveram correlação com a taxa de blastocisto. Porém, a taxa de clivagem e de produção de blastocisto foram semelhantes entre eles. Estudos mais específicos das correlações espermáticas e taxa de produção de blastocisto devem ser realizados, uma vez que as características antes e após a seleção de gradiente *Percoll* podem ser variadas, com influência de touro e protocolos utilizados, sem que haja uma clara relação com a taxa de clivagem e blastocisto (Alomar et al., 2006).

Outra diferença na PIV foi encontrada ao se comparar a taxa de blastocisto entre os grupos em relação ao número de ovócitos clivados. Foi observado que no grupo não sexado utilizando gradiente de *Percoll* 90:45% uma maior porcentagem dos ovócitos que clivaram, se desenvolveram até o estágio de blastocisto, sugerindo uma maior porcentagem de embriões degenerados nos grupo sexados e no NS60, não havendo portanto diferença do sexado para o controle. Esses resultados diferem dos obtidos por Sartori et al. (2004) que mostraram uma alta taxa de embriões degenerados em novilhas superovuladas, quando sêmen sexado foi comparado ao não sexado.

Outra variável estudada juntamente com a taxa de blastocisto foi a cinética de desenvolvimento embrionário. De acordo com alguns autores (Avery et al., 1991; Lu et al., 1999; Gutiérrez-adán et al., 2000) embriões machos produzidos *in vitro*, se desenvolvem mais rapidamente do que embriões fêmeas durante os 7 a 8 primeiros dias após a fecundação. No presente estudo, assim como em outros trabalhos (Grisart et al., 1995; Holm et al., 1998; Morton et al., 2007), não houve diferença na cinética de desenvolvimento de embriões produzidos com sêmen sexado macho, fêmea ou não sexado. Esta variação nos resultados pode ser devida à influência de touros, de protocolos utilizados para FIV ou componentes nos meios de cultivo

(Peippo et al., 2001). Outro aspecto interessante é que na produção comercial de embriões PIV em geral ocorre um maior nascimento de produtos do sexo masculino, sendo que muitos autores citam que uma maior percentagem de embriões machos se desenvolvem e que o embrião fêmea seria mais sensível à manipulação *in vitro*. Esse fato não foi comprovado no presente estudo, sendo os embriões produzidos com sêmen contendo espermatozóide sexado Y os que menos se desenvolveram apresentando cerca de 10% a menos de blastocisto do que o NS60 e cerca de 5% a menos do que utilizando sêmen contendo espermatozóide sexado X.

Os resultados do presente estudo mostraram claramente um efeito do protocolo de seleção espermática em diversas variáveis de avaliação espermática e na PIV. Esse efeito não pode ser explicado somente pela seleção de espermatozoides mais móveis e mais íntegros. É possível que o gradiente 90:45% selecione células com características adicionais que não foram avaliadas no presente estudo.

Como já mencionado e mostrado por diversos autores todos os procedimentos utilizados no processo de sexagem podem afetar características do espermatozóide e causar uma redução da fertilidade. Entretanto, neste estudo essa redução na fertilidade não foi observada. É possível que a redução da motilidade e da porcentagem de células com acrossoma e membrana intactos claramente causada pelo processo de sexagem possam não ser tão cruciais para as condições *in vitro* em que os espermatozoides são colocados diretamente em contato com o ovócito. Mas poderiam explicar a redução na fertilidade *in vivo* utilizando IA, em que as condições a que os espermatozoides são submetidos são bastante distintas. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade da sexagem causar algum dano que não foi possível detectar com as avaliações realizadas no presente estudo. Ou seja, que não sejam visíveis morfologicamente no estágio de blastocisto em D9, mas que venham a se manifestar posteriormente na taxa de prenhez. Alterações tais como maior proporção de mitocôndrias imaturas e lesão de membrana nuclear (Palma et al., 2008) e redução na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (Morton et al., 2007) foram identificadas em embriões produzidos com sêmen sexado quando comparados aos produzidos com sêmen não sexado, e poderiam afetar este embrião em um estágio mais avançado do desenvolvimento. Estas alterações puderam ser confirmadas em um estudo realizado por Bodmer et al. (2005), que detectaram maior perda embrionária entre 30 e 90 dias após IA com sêmen sexado em relação ao não sexado em vacas e novilhas, apesar da taxa de concepção ter sido semelhante. Outro fator que também deve ser

considerado é que o sêmen de alguns touros é mais afetado negativamente pelo processo de sexagem do que de outros, apresentando diferentes taxas de blastocisto (Blondin et al., 2009). Considerando que todas as amostras de sêmen utilizadas no presente estudo foram adquiridas em uma central comercial, é possível que seja feita uma seleção prévia na própria central daqueles touros cujas células espermáticas sejam mais resistentes ao processo de sexagem, apresentando taxa de fertilidade *in vitro* semelhante à do não sexado.

É importante ressaltar também que desde o desenvolvimento da técnica na década de 80, esta vem sendo constantemente aprimorada pelas empresas através de modificações nos parâmetros do aparelho, tais como tempo de exposição ao Hoechst, pressão da sexagem, velocidade de passagem do espermatozóide e angulação da incidência do *laser*. Desta forma, uma nova geração de citômetros e sistemas de *laser* estão sendo continuamente pesquisados, visando à obtenção de células com melhor viabilidade espermática após sexagem. Portanto, com essas modificações é possível que os problemas causados pelo processo tenham sido reduzidos nos últimos anos.

6 CONCLUSÃO

O processo de sexagem por citometria de fluxo afeta algumas características estruturais da célula espermática, mas não afeta a sua capacidade de produzir embriões *in vitro*. Além disso, a cinética de desenvolvimento de embriões machos e fêmeas produzidos *in vitro* é semelhante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, G.P.; ÁLVAREZ, R.H. Métodos de separação de espermatozóides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Brazilian Industry Animal**, v. 60, p. 107-115, 2003.
- 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 Reproduction Science**, v. 107, p. 48-61, 2008.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 95-97, 2006.
- AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine in vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 35, p. 953-963, 1991.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press, 1989. 285 p.
- BELLETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 22, p. 85-90, 2005.
- BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; RIZO, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Can bovine in vitro matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 594-597, 2008.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.

- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DEN DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 43-48, 2005.
- BOE-HANSEN, G.B.; MORRIS, I.D.; ERSBOLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.
- BORDGNON, V.; SMITH, L.C.; UV-irradiated sperm activated oocyte but arrest pre implantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1513-20, 1999.
- CARVALHO, J.O.; MACHADO, G.M.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Comparison of different techniques to evaluated membrane and acrosome 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.
- CHASTANT-MAILLARD, S., DRUAT, X. Sexagem de espermatozóide bovino. **A Hora Veterinária**, v. 143, p. 43-48, 2005.
- 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 embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, p. 1185-1193, 2006.
- CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997.
- DELL'AQUA JR, J.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. In: a XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 346 (supl 1), 2006, Araxá. **Anais... Araxá: Acta Scientiae Veterinariae**, p. 205-212, 2006.
- EMMENS, C.W. Insemination pH and the sex ratio in rabbits. **Journal Hered**, v. 51, p. 156-157, 1960.
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRE, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.
- GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.

- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008.
- GRISART, B.; MASSIP, A.; COLLETTE, L.; DESSY, F. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. **Theriogenology**, v. 43, p. 1097-1106, 1995.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; LA FUENTE, J. Effect of the in vitro culture system of the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2000.
- HARRISON, R.A.P.; 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.
- HOLLINSHEAD, F.K.; O'BRIEN, J.K.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 958-968, 2004.
- HOLM, P.; SHUKRI, N.N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Development kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, p. 1285-1299, 1998.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V.; PINKEL, D. Flow sorting of X and Y chromosome bearing into two populations. **Gamete Research**, v. 16, p. 1-9, 1987.
- JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; HAMK, H.W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 199-203, 1989.
- KANEKO, S.; OSHIO, S.; KOBAYASHI, T.; LIZUKA, R.; MOHRI, H. Human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 124, p. 950-955, 1984.
- KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 58-62, 2007.
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 63-67, 2007.
- KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E.A.; HÄMMERLING, U. Topographical localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Production National Academy Science**, v. 70, p. 1502-1505, 1973.

- LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393-1405, 1999.
- LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.
- MANELLA C.A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000.
- MARINHEIRO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation an sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 1289-1297, 2009.
- MARTINS, C.F.; DODE, M.A.N.; BÁO, S.N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 94-104, 2007.
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.
- MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n.8, p. 931-940, 2007.
- NELDER, J.A.; WEDDERBUM, R.W.M. Generalized Linear Models. **Journal Research Statistic Society**, v. 135, p. 370-384, 1972.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMÜLLER, C.; 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.
- 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.

- PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Development kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, p. 105-113, 2001.
- PUGLISI, R.; VANNI, R.; GALLI, A.; BALDUZZI, D.; PARATI, K.; BONGIONI, G., CROTTI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; ALEANDRI, R. In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometric and validated for accuracy by real-time PCR. **Reproduction Research**, v. 132, p. 519-526, 2006.
- RUMPF, R.; DODE, M.A.N.; SILVA, A.E.D.F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: **Simpósio nacional de melhoramento animal**, 3, 2000, Belo Horizonte: [Anais...]. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, p. 248-253, 2000.
- SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIZER, L.N.; SCHENCK, J.L.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86-90, 2004.
- SCHENCK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299-307, 2005.
- SHENCK, J.L.; CRAN, D.G.; EVERESTT, R.W.; SEIDEL JT, G.E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminated, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, p. 717-728, 2009.
- SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminated and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 129-138, 2008.
- SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z., GREEN, R.D. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-1420, 1999.
- SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4-10, 2009.
- SHETTLES, L.B. Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature**, v. 188, p. 918-919, 1960.
- SMITH, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 39-34, 1993.
- SOUZA, A.H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; MONSON, R.; WILTBANK, M.C. Effect of semen source and dose of FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**, v. 4, p. 70-76, 2007.

- SUH, T.K.; SCHENK, J.L.; SEIDEL JR, G.E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035-1048, 2005.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 127-132, 2002.
- TRENTALANCE, G.M.; BEORLEGUI, N.B. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. **Andrologia**, v. 34, p. 397-403, 2002.
- 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.
- WATKINS, A.M.; CHAN, P.J.; KALUGDAN, T.H.; PATTON, W.C.; JACOBSON, J.D.; KING, A. Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p.709-712, 1996.
- 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, 2005.

ANEXO

Anexo A. Setup do Hamilton Thorne Biosciences (IVOS-Ultimate 12)

• Característica	Ajuste
• Captura de imagens	
Número de imagens adquiridas por campo.....	30
Taxa de aquisição das imagens.....	60 Hz
• Detecção da célula	
Contraste mínimo da célula	80
Tamanho mínimo da célula.....	5 pix
• Células progressivas	
Velocidade de trajeto (VAP).....	50,0 µm/s
Retilinearidade (STR).....	70%
• Valor de corte VSL para células lentas.....	10 µm/s
• Padrão	
Tamanho da célula.....	5 pix
Intensidade da célula.....	70
• <i>Setup</i> óptico	
Intensidade.....	2000 - 220
Fotômetro.....	50-55
• Tipode câmara	Leja®
• Temperatura.....	37°C
• Seleção de campos.....	Manual

Anexo B. Solução do teste de capacitação pela Clortetraciclina (CTC)

B.1 Solução de 1,4-Diazabicyclo [2.2.2.] Octane, DABCO: 0,22 M

- PBS pH 7,4.....10 mL
- DABCO (Sigma-D2522).....0,247g

Obs: - aliquotar em volumes de 60 μ L e conservar a -20°C

B.2 solução de glutaraldeído (50%) em TRIS (2,5M)

- TRIZMA BASE0,302 g
- Água Mili Q.....1000 μ L
- Solução de Glutaraldeído 5.....1000 μ L

Obs:-preparar diariamente

B.3 solução estoque de TRIS-NaCl : 20mM/130mM; pH 7,8)

- TRIZMA BASE1,21 g
- NaCl3,8 g
- Água Mili Q.....500 mL

Obs:- aliquotar em volumes de 10 mL e conservar a -20 °C

B.4 Solução de trabalho de CTC

- Solução estoque de TRIS-NaCl.....10 mL
- CTC0,0038 g
- L-Cisteína0,0088 g

Obs:-preparar diariamente e estocar a 4°C, protegido da luz

Anexo C. Solução para avaliação da integridade de membrana plasmática

C.1 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução I

- IP.....10 mg
- Solução salina 0,9%.....20 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20°C protegido da luz

C.2 Solução estoque de C-FDA – Solução II

- C-FDA9,2 mg
- DMSO20 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20°C protegido da luz

C.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 40%.....4 mL
- Solução salina 0,9%.....96 mL

C.3 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio3 g
- Solução salina 0,9%.....100 mL

C.4 Solução de trabalho de C-FDA

- Solução I.....2 %
- Solução II.....1 %
- Solução III.....1 %
- Solução IV.....96 %

Obs:-preparar diariamente e estocar a 4°C, protegido da luz

Anexo D. Solução para avaliação da integridade acrossomal

D.1 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução I

- IP.....10 mg
- Solução salina 0,9%.....20 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 μ L e conservar a -20°C protegido da luz

D.2 Solução estoque de PNA – Solução II

- PNA1 mg
- Tampão Fosfato (PBS).....1 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 μ L e conservar a -20°C protegido da luz

D.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 40%.....4 mL
- Solução salina 0,9%.....96 mL

D.4 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio3 g
- Solução salina 0,9%.....100 mL

D.4 Solução de trabalho de PNA

- Solução I.....2 %
- Solução II.....1 %
- Solução III.....1 %
- Solução IV.....96 %

Obs:-preparar diariamente e estocar a 4°C, protegido da luz

Anexo E. Solução para avaliação da integridade de cromatina

E.1 Solução fixadora

- Metanol30 mL
- Ácido acético.....10 mL

E.2 Solução de ácido cítrico (80mM/L) e fosfato de sódio dibásico (15 mM/L)

- Ácido cítrico1,53 g
- Fosfato de sódio dibásico0,231 g
- Água Mili Q.....100 mL

E.3 Solução de alaranjado de acridine

- Alaranjado de acridine.....20 mg
- Água Mili Q.....100 mL

Obs: Preparar todas as soluções diariamente

Anexo F: Solução para coloração com lacmóide

- Lacmóide1 g
- Ácido acético45 mL
- Água Mili Q.....100 mL

Obs: filtrar a solução em filtro de papel

Anexo G – Tabela com taxa clivagem e produção de blastocisto de quatro touros em dois diferentes gradientes de *Percoll*.

G.1 Tabela descritiva da taxa de clivagem e produção de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo (média \pm EP), após fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado de quatro touros e touro controle (TC) em gradiente de *Percoll* 45:90%

Touro	Ovócitos	Clivagem	D6	D7	D8	D9
TC	355	80,3 \pm 4,1	18,6 \pm 3,2	38,8 \pm 3,9	43,7 \pm 4,0	44,5 \pm 4,1
1	164	69,6 \pm 2,1	19,0 \pm 1,4	46,8 \pm 2,5	53,2 \pm 2,0	55,3 \pm 2,1
2	136	53,1 \pm 1,9	15,9 \pm 1,6	19,3 \pm 3,0	31,2 \pm 1,5	31,6 \pm 1,8
3	92	60,0 \pm 2,6	14,8 \pm 1,8	30,1 \pm 2,7	37,7 \pm 2,0	37,7 \pm 2,0
4	146	43,7 \pm 2,0	1,0 \pm 0,5	11,7 \pm 2,2	18,4 \pm 2,0	20,3 \pm 2,3

G.2 Tabela descritiva da taxa de clivagem e produção de blastocisto nos dias 6, 7, 8 e 9 de cultivo (média \pm EP), após fecundação *in vitro*, utilizando sêmen não sexado de quatro touros em gradiente de *Percoll* 45:60%

Touro	Ovócitos	Clivagem	D6	D7	D8	D9
1	150	68,0 \pm 2,0	14,2 \pm 2,2	39,3 \pm 2,4	48,2 \pm 2,6	50,9 \pm 2,9
2	141	57,5 \pm 2,6	8,1 \pm 1,9	21,1 \pm 2,3	21,1 \pm 2,6	21,6 \pm 2,6
3	124	41,2 \pm 2,9	4,0 \pm 1,4	13,9 \pm 1,9	15,9 \pm 2,2	16,6 \pm 2,2
4	101	40,3 \pm 2,3	2,7 \pm 1,1	8,9 \pm 1,8	8,9 \pm 1,8	8,9 \pm 1,8