

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADES DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COM ESPERMATOZÓIDES
SEXADOS POR GRADIENTE DE DENSIDADE OU POR
CITOMETRIA DE FLUXO**

Aline Costa de Lucio

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientador: Dr. Alfonso Gutiérrez Ádan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

JULHO 2011

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

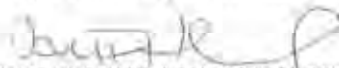
TÍTULO: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO COM ESPERMATOZÓIDES SEXADOS POR GRADIENTE DE DENSIDADE OU POR CITOMETRIA DE FLUXO

AUTORA: ALINE COSTA DE LUCIO

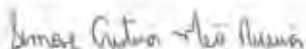
ORIENTADORA: Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALFONSO GUTIÉRREZ-ÁDAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA
Departamento de Med Vet Prev e Rep Animal / FCAVJ



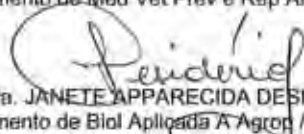
Profa. Dra. SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP



Profa. Dra. BEATRIZ DA COSTA AGUIAR ALVES REIS
Centro de Pesquisas Em Biotecnologia / Universidade de Sao Paulo



Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Med Vet Prev e Rep Animal / FCAVJ



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biol Aplicada A Agroc / FCAVJ

Data da realização: 15 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE COSTA DE LUCIO – nascida na cidade de Campinas, em 4 de agosto de 1981. Ingressou em março de 2000 no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária em Jaboticabal. Foi bolsista do PET/SESU de agosto de 2001 a julho de 2004. Graduou-se em Zootecnia em janeiro de 2005. Iniciou em março de 2005 o curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, em nível de mestrado (Bolsista FAPESP) na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária em Jaboticabal, concluindo em julho de 2007. Ingressou em agosto de 2007, no curso de doutorado (Bolsista CAPES) nesta mesma instituição. No período de outubro de 2010 a fevereiro de 2011, realizou estágio de doutorado sanduiche (Bolsista CAPES/Fundação Carolina) no Instituto nacional de Tecnologia Agrária e Alimentaria (INIA), Madrid, Espanha.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

Dedico

Aos meus pais Lourdes e Felício

Aos meus avós Sylvio e Tereza

Ao Mateus e ao Gustavo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a minha fortaleza.

Aos meus pais, Lourdes Ap. Costa de Lucio e Felício Antônio de Lucio por me ensinarem tudo que sei em relação aos valores, princípios morais e ética, por me darem conselhos, por me incentivarem e ajudarem a trilhar mais um caminho em minha vida.

Ao Mateus de Oliveira Dedemo Prado, pelo apoio em todos os momentos. Por ter acreditado em mim, sempre me incentivando a nunca desistir, principalmente nos momentos mais difíceis, por suportar a distância, por ser sempre meu companheiro, amigo e porto seguro.

Ao meu irmão Gustavo Costa de Lucio, aos meus avós Tereza Fornazieiro Costa e Sylvio de Lucio, e as minhas tias Mara de Lucio e Silvia de Lucio, por estarem sempre presente nas horas mais difíceis, e sempre me trazendo palavras de sabedoria.

Às pessoas que me incentivaram a trilhar esse caminho com palavras de sabedoria e conforto: todos os meus familiares (são muitos), os meus sogros João Augusto Dedemo Prado e Lucia Helena de Oliveira Dedemo Prado, e às minhas cunhadas Drielli de Oliveira Dedemo Prado e Lílian Kimi Takahashi .

À Profa. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, primeiramente pela amizade, por todo o esforço que desempenhou para a minha formação como aluna e como pessoa, pelo apoio em todas as decisões tomadas por mim desde o primeiro ano de doutorado, pelas viagens a Botucatu, idas aos frigoríficos, laboratórios em quarto de hotel, por ter me acolhido em sua casa, e por toda a contribuição para que eu conseguisse desenvolver este projeto de doutorado. Muito obrigado por ter acreditado e confiado em mim nos momentos mais difíceis de sua vida, e por fazer parte da minha vida.

Ao Dr. Alfonso Gutiérrez-Ádan, por me receber em seu laboratório, pela incrível oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa, por auxiliar diretamente no desenvolvimento desta pesquisa, por ajudar no meu crescimento pessoal e profissional.

À Dr. Sara Yamaguishi Tomita pela amizade e confiança, por abrir as portas de seu laboratório para a realização deste projeto, por contribuir com idéias e conhecimentos para a estruturação deste projeto.

À Dr. Beatriz Costa Aguiar Alves Reis, à Dra. Simone Cristina Méo Niciura, à Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e à Dra. Flávia Lombardi Lopes, por aceitarem contribuir com seus conhecimentos profissionais para a finalização deste trabalho.

À Dra. Lucia Galvão de Albuquerque por contribuir diretamente para a realização desta pesquisa, com dicas e conceitos fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Miguel Angel Ramirez e ao Dr. Dimitrios Rizos, por compartilharem experiências fundamentais para a realização deste trabalho.

À Eva Pericuesta Camacho e Alberto Miranda-Bedate, por contribuírem com conhecimentos para a realização deste trabalho e, principalmente pela amizade.

À Roberta Vantini, Isabel Aparecida Penariol Natarelli, ao Ivo Luiz de Almeida Jr. e ao Edson por estarem presentes e prontos para ajudarem em qualquer momento. Obrigada por auxiliarem na execução desta tese com palavras, trabalho e ofícios!

Aos docentes do departamento de Reprodução animal, especialmente ao Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela amizade, apoio e conselhos durante esses anos de doutorado.

Às amigas Greyci Mitzi Bezerra Moreno, Iolanda Reis e Rosângela Rodrigues Bráz pela amizade, convivência, conselhos e as mais longas conversas durante o almoço e durante o chá da noite.

Às bruxas: Adriana Santana do Carmo, Amanda Nonato, Anne Melina Bianchin Monteiro, Ana Paula Perini, Eliandra Antonia Pires Buttler, Fernanda Celestino Morato, Jacqueline de Andrea Dernowseck-Meirelles, Maria Carolina Villane Miguel, Leticia Zoccolaro de Oliveira e Verónica Gonzalvez Cadavid, por fazerem mais fáceis os momentos difíceis e mais alegres os momentos mais felizes!

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal: Aracelle Alves, Clara Slade de Oliveira, Juliana Corrêa Borges da Silva, Juliana de Souza Pinto Perioni, Kellen Souza de Oliveira, Marcelo Barbosa Bezerra, Maria Emilia Franco Oliveira, Maricy Apparicio, Max Vitória Resende, Michelly Fernandes de Macedo, Naiara Zoccal Saraiva, Rúbia Bueno da Silva, Tathiana Ferguson Motheo e Tatiane Drummond Tetzner, pela amizade, convívio e experiências profissionais compartilhadas.

Aos amigos do INIA: Alesandra, Célia Frutos, Priscila, Raul Fernández-Gonzales, Ricardo Laguna Bazarra, Rommel Moros e Verónica Maillo, pela valiosa amizade, pelos divertidos “desayunos”, pelas noites de “tapas”, pelas terças de futebol e pela paciência quando falava portunhol.

Aos companheiros de república em Madrid: Luan de Sá Souza e Tissyanne Rocha Lima, pelo apoio e companheirismo nos meses em que passei na Espanha.

À CAPES pelas Bolsas concedidas.

SUMÁRIO	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTDE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1. Utilização da técnica de sexagem de espermatozóides na inseminação artificial (IA) e na produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	23
2.2. Importância da seleção do sexo no melhoramento genético animal.....	26
2.3. Citometria de fluxo.....	28
2.4. Centrifugação em Gradiente de densidade	31
2.5. Expressão gênica de embriões bovinos.....	32
2.6. Genes candidatos para qualidade embrionária	35
2.6.1. Genes associados ao reconhecimento da gestação e formação da placenta.....	35
2.6.1.1. AKR1B1 e COX2.....	35
2.6.1.2. IGF2R.....	37
2.6.1.3. PLAC8.....	38
2.6.2. Genes associados à resposta oxidativa (MnSOD e GPX1).....	39

2.6.6. Gene associado ao metabolismo celular (SCL2A1).....	40
2.6.7. Gene associado a apoptose celular (TP53).....	41
2.7. O genoma paterno e o desenvolvimento embrionário.....	42
3. HIPÓTESE.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1. Obtenção dos espermatozóides e grupos experimentais.....	48
5.2. Centrifugação em gradiente de densidade.....	48
5.2.1. Preparação dos gradientes descontínuos de densidade.....	48
5.2.2. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides nos gradientes de sexagem.....	50
5.3. Citometria de Fluxo.....	51
5.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	52
5.4.1. Obtenção e seleção dos oócitos.....	52
5.4.2. Maturação <i>in vitro</i>	53
5.4.3. Fecundação <i>in vitro</i>	54
5.4.4. Desenvolvimento <i>in vitro</i>	55
5.4.5. Forma de análise dos resultados para a PIVE.....	56
5.5. Comparação da expressão gênica de embriões produzidos <i>in vitro</i> com sêmen sexado.....	56
5.5.1. Extração de RNA de embriões produzidos <i>in vitro</i>	56
5.5.2. Transcrição reversa.....	57
5.5.3. PCR em tempo real.....	57

5.5.4. Análise estatística.....	61
6. RESULTADOS.....	62
6.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	62
6.2. Efeito do método de sexagem na expressão gênica de embriões.....	63
7. DISCUSSÃO.....	69
7.1. Produção <i>in vitro</i> e embriões.....	69
7.1.1. Centrifugação em gradiente de densidade.....	70
7.1.2. Citometria de Fluxo.....	71
7.2. Expressão gênica de embriões.....	73
7.2.1. Genes envolvidos nos processos de reconhecimento de gestação e formação da placenta (AKR1B1, COX2, IGF2R, PLAC8).....	74
7.2.2. Genes relacionados a resposta oxidativa (MnSOD e GPX1).....	78
7.2.3. SCL2A1 (metabolismo celular).....	79
7.2.4. TP53 (apoptose celular).....	81
8. CONCLUSÃO.....	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.	59
Tabela 2. Controle de qualidade da produção <i>in vitro</i> de embriões considerando como parâmetros as taxas de clivagem e de blastocisto.	62
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de CT e Δ CT, dos genes candidatos para qualidade embrionária, para os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo.	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção do gradiente descontínuo de densidade - G14 (B) 49
- Figura 2. Centrifugação em centrífuga refrigerada de rotor horizontal (A e B); recuperação dos espermatozóides por um sistema á vácuo (C); recuperação do pelete (D). 50
- Figura 3. Esquema da sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo. 52
- Figura 4. Aspiração de ovários de matadouro (A); oócitos grau 1 selecionados pós-aspiração para serem maturados *in vitro*. 53
- Figura 5. Oócitos maturados *in vitro*. 54
- Figura 6. Desenvolvimento embrionário humano: embrião com 2 células (A); embrião de 8 células (B); embrião de 16 células (C); mórula (D); blastocisto (E); blastocisto eclodindo (F). 56
- Figura 7. Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de “threshold” (definido como o ponto médio da janela de linearidade). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de “threshold” corresponde ao ciclo do “threshold” (Ct). 60
- Figura 8. Diferença de expressão, para os genes relacionados ao reconhecimento de gestação e formação da placenta, entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão. 65
- Figura 9. Diferença de expressão, para os genes relacionados à resposta oxidativa entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem 66

entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

Figura 10. Diferença de expressão, para o gene relacionado ao metabolismo celular entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

67

Figura 11. Diferença de expressão, para o gene envolvido em mecanismos de apoptose celular entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

68

LISTA DE ABREVIATURAS

μ - micrômetro

μg - micrograma

μL - microlitro

μM - micromolar

AA – ácido aracdônico

AKR1B1 – aldo-keto redutase familia B1 tipo 1

ANOVA – análise de variância

BAX – “BCL2 associated X protein”

BSA – albumina sérica bovina

cDNA – DNA complementar

COC – complexo *cumulus* - oócito

COX 1 – ciclooxigenase tipo 1 ou “prostaglandin G/H synthase type 1”

COX 2 – ciclooxigenase tipo 2 ou “prostaglandin G/H synthase type 2”

CQ– ciclo de quantificação

DMEM – “Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium”

DNTMA3 – “DNA metiltransferase 3α”

FIV – fecundação *in vitro*

FSH – hormônio folículo estimulante

G14 – Gradiente 14

G6PD – glicose-6-fosfato-desidrogenase

GLUT 1 – “glucose transporter type 1”

GPX 1 – glutationa peroxidase tipo 1

GSMT 3 – “glutathione – S – tranferase Um type 3”

H2AFZ – histona H2Az

hCG – gonadotrofina coriônica humana

HEPES – N(2-Hydroxethyl)piperazine –N` (ethanesulfonic acid)

HSP – “heat shock protein”

IA – Inseminação Artificial

IGF - “insulin-like growth factor”

IGF2R – “insulin-like growth factor 2 receptor”

min – minutos

mL - mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

MnSOD – manganês superóxido dismutase

MOTE – múltiplas ovulações e transferência de embriões

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PG - prostaglandina

PGRMC1 – receptor de membrana de progesterona tipo 1

PGRMC2 – receptor de membrana de progesterona tipo 2

pH - potencial Hidrogeniônico

PIVE – Produção *in vitro de embriões*

PLAC8 – “placenta specific type 8”

pmol - picomol

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

ROS – espécies reativas de oxigênio

SCL2A1 – “solute carrier family 2 (facilitate glucose transporter) member 1”

SE – solução estoque

SFB – soro fetal bovino

SOF – fluido sintético de oviduto

TALP – “tyrode`s albumin – lactate – pyruvate”

TCM – Meio para cultivo de tecidos

TP53 – proteína tumoral p53

xg – vezes a gravidade

XIST – “X (inactive)-specific transcript”

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COM ESPERMATOZÓIDES SEXADOS POR GRADIENTE DE DENSIDADE E POR CITOMETRIA DE FLUXO

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi verificar se existem diferenças no desenvolvimento de embriões produzidos com sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade e por citometria de fluxo e também quantificar a expressão relativa de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. Após a sexagem os espermatozóides foram submetidos a produção de embriões *in vitro*. Foram avaliadas as taxas de clivagem e blastocisto para verificar a influência do método de sexagem no desenvolvimento *in vitro* de embriões. Os blastocistos foram coletados nos dias 7 e 8 de desenvolvimento, e submetidos a extração de RNA para a avaliação da expressão de genes relacionados a qualidade do embrião: AKR1B1, COX2, IGF2R, PLAC8 (desenvolvimento de placenta e reconhecimento da gestação), MnSOD e GPX1 (estresse oxidativo), SCL2A1 (metabolismo) e TP53 (apoptose). Os resultados não mostraram diferenças no desenvolvimento *in vitro* de embriões (taxas de clivagem e blastocisto) produzidos com sêmen sexado. Em relação ao padrão de expressão, a citometria de fluxo reduz os níveis de mRNA dos genes AKR1B1 (P=0,023), COX2 (P=0,016). A centrifugação em gradiente de densidade aumentou os níveis de transcritos dos genes PLAC8 (P=0,007), MnSOD (P=0,013) e GLUT1 (P=0,028). Ambas as técnicas reduzem os níveis de expressão do gene TP53 (P<0,05). A técnica de sexagem por citometria de fluxo altera a expressão de genes envolvidos no processo de implantação, prejudicando o nascimento de uma cria viável. A sexagem produz embriões que não possuem alterações prejudiciais em genes envolvidos no reconhecimento da gestação e formação da placenta, os quais são muito importantes para o processo de implantação; aumenta o padrão de expressão dos genes envolvidos no processo de resposta da célula ao estresse oxidativo e no metabolismo celular, resultando em embriões de melhor qualidade e que são capazes de implantar e possivelmente gerar uma cria viável. Podemos concluir que a centrifugação em

gradiente de densidade pode ser considerada uma alternativa à citometria de fluxo por causar menos danos aos embriões produzidos *in vitro*.

Palavras chave: produção *in vitro* de embriões, PCR em tempo real, qualidade embrionária, sexagem de espermatozoides.

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF BOVINE EMBRYOS *IN VITRO* PRODUCED WITH SORTED SPERM BY DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION AND FLOW CYTOMETRY

ABSTRACT - The purpose of this work was evaluate differences on development of embryos produced *in vitro* using sorted semen by density gradient centrifugation and flow cytometry, and differences in relative abundance of important genes for embryo development. Cleavage and blastocyst rates were used to evaluate the influence of the sorting procedure on embryo development. Blastocysts of day 7 and 8 of development were collected, and expression levels quantification AKR1B1, COX2, IGF2R, PLAC8, MnSOD, GPX1, SCL2A1 and TP53, genes related to embryo quality were evaluated. The results showed no differences between the experimental groups in terms of embryo development (cleavage and blastocyst rates). In the expression pattern, flow cytometry methodology reduced mRNA abundance of AKR1B1 (P=0.023) and COX2 (P=0.016). Density gradient centrifugation increased the transcripts levels of PLAC8 (P=0.007), MnSOD (P=0.013) and GLUT1 (P=0.028). Both sorting process reduced mRNA of TP53 (P<0.05). Flow cytometry affects the expression pattern of genes involved in pregnancy recognition and placenta formation, resulting in poor quality embryo. Density gradient centrifugation methodology do not alter the expression of genes involved in embryo implantation, increases the expression pattern of genes related to oxidative response and metabolism, resulting in viable embryos. These results suggesting that density gradient centrifugation can be an alternative to flow cytometry, for produce viable embryos.

Key words: embryo quality, *in vitro* embryo production, real time PCR, sperm sex selection.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é o procedimento utilizado na tentativa de promover o melhoramento genético em animais de interesse zootécnico, sendo alternativa à técnica convencional de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE). Tem-se encontrado muitas dificuldades no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, desde o nascimento do primeiro bezerro em 1982 (BRACKETT et al., 1982). Durante as últimas décadas a produção de embriões foi melhorada, principalmente nos passos que visam imitar o sistema natural de desenvolvimento embrionário.

Apesar do seu amplo uso, a PIVE possui algumas limitações, como por exemplo, o sistema de cultivo *in vitro* que favorece o desenvolvimento de maior número de embriões do sexo masculino (GUTIÉRREZ-ÁDAN et al., 2001; 2004). Devido a este fato, métodos para separar populações de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y são utilizados. A técnica de sexagem de espermatozoides disponível comercialmente é a citometria de fluxo, com 90% de acuidade, mas com relatos de diminuição da viabilidade espermática. Esse processo de sexagem pode ser responsável por variações nas taxas de clivagem (0 a 89%), de blastocistos (3,5 a 38,8%) e de prenhez após os 60 dias, bem como reduzido número de nascimentos (PALMA et al., 2008; UNDERWOOD et al., 2010).

Os embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria de fluxo apresentam alta proporção de mitocôndrias imaturas e membranas nucleares danificadas (PALMA et al., 2008) e expressão reduzida de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (MORTON et al., 2007; BERMEJO-ÁLVAREZ, et al., 2010a). A quantificação relativa de mRNA de vários genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (FARIN et al., 2004; DODE et al., 2006) e quando este padrão de expressão é alterado, pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário e à ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in vitro* estejam desprovidos do potencial para sustentarem a transferência e implantação

(WRENZYCKI et al., 2005), contribuindo para as altas taxas de perda embrionária nos períodos de 30 a 90 dias de gestação (BODMER et al., 2005; UNDERWOOD et al., 2010).

Os riscos associados com o processo de sexagem por citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342, exposição à luz ultravioleta, alta pressão) podem ser responsáveis por danos no DNA do espermatozóide (LIBBUS et al., 1987), mas não impedem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, podendo esses efeitos deletérios se manifestarem apenas nos estágios mais tardios de desenvolvimento (CARVALHO et al., 2010). Danos no DNA estão relacionados com falhas na gestação (VIRRO et al., 2004), alterações no padrão de mRNA e efeitos a longo prazo em crias nascidas (FERNANDÉZ-GONZALEZ et al., 2008).

O sêmen sexado por citometria de fluxo pode alterar o padrão de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário, mostrando que o processo pode causar danos ao espermatozóide, redução da fertilidade e perda de gestação (MORTON et al., 2007). Portanto, a centrifugação em gradiente de densidade está sendo testada como um método alternativo de separação de espermatozóides com o propósito de preservar a viabilidade do espermatozóide.

Em bovinos, a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™, separa, com acuidade de até 73%, populações de espermatozóides X. Quando estes espermatozóides foram utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; 2003; 2011a). Esta técnica tem como vantagem a separação de sêmen congelado e *in natura* e é capaz de selecionar espermatozóides morfologicamente viáveis com 90% de motilidade. Mas quando se utiliza a sexagem de sêmen congelado, há aumento na incidência de células que sofreram capacitação espermática (LUCIO, 2007; OLIVEIRA, 2009). O aprimoramento deste método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™, principalmente, no que se refere à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides.

Com base nessas afirmações o presente trabalho tem como objetivos, avaliar as taxas de clivagem e de blastocistos de embriões produzidos *in vitro* com sêmen convencional, sêmen sexado pelo gradiente de densidade e pela citometria de fluxo; e avaliar o padrão da expressão de genes candidatos para a qualidade embrionária de embriões produzidos *in vitro* com sêmen convencional, sêmen sexado pelo gradiente de densidade e pela citometria de fluxo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Utilização da técnica de sexagem de espermatozóides na inseminação artificial (IA) e na produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Em bovinos, a seleção do sexo tem valor econômico e genético significativos quando está associada à Inseminação Artificial (IA) e à produção *in vitro* de embriões PIVE, nos sistemas nos quais a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (SPLAN et al., 1998; HOHENBOKEN, 1999) e desde que a metodologia utilizada não diminua a eficiência reprodutiva (WEIGEL, 2004).

No Brasil, o aumento de rebanhos submetidos a Programas de Melhoramento Genético e Cruzamento Industrial, desde 1989, permitiu que as vendas de sêmen congelado aumentassem mais de 58,75% em 10 anos (ASBIA, 2009). Dos 9,16 milhões de doses comercializadas em 2009, 59,19% são de genética nacional.

Segundo dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões são transferidos no país 270 mil embriões bovinos por ano, o que corresponde a 86,60% dos embriões transferidos mundialmente, atingindo o primeiro lugar na aplicação dessa biotecnologia (IETS, 2008). As raças predominantemente exploradas são as raças zebuínas, atingindo 94% da produção de embriões no Brasil (O Embrião, 2010).

A técnica de produção *in vitro* de embriões, embora apresente algumas limitações de seu uso, no Brasil tornou-se uma realidade comercial que movimenta uma cadeia produtiva que deve ter faturado somente em 2005 mais de R\$ 70.000.000,00 (MOREIRA, 2006). As limitações técnicas ainda não superadas são:

a) sistema de cultivo desvia a proporção dos sexos para o masculino (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004);

b) dificuldade em criopreservar os embriões com índices de aproveitamento correspondentes aos obtidos pelos embriões produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2003).

Considerando o mercado mundial, as empresas e cooperativas têm tentado contornar o desvio da proporção sexual em favor do sexo masculino no sistema de cultivo da PIVE utilizando espermatozóides sexados pelo método de citometria de fluxo.

Como em outros países, a produção, a venda e a utilização de doses de sêmen sexado pela técnica disponível comercialmente (citometria de fluxo) está aquém da demanda do Brasil (ASBIA, 2009). Em três anos (2006 a 2009) foram comercializadas apenas 500 mil doses de sêmen sexado (CRV LAGOA, 2009) o que representa 5,45% dos mais de 9,16 milhões de doses vendidas. Os fatores que definem esse cenário são:

a) os procedimentos durante a sexagem pelo citômetro de fluxo garantem a acuidade de 85%, mas causam danos na viabilidade espermática, levam a baixa taxa de prenhez após os 90 dias da IA (média de 30%) e, conseqüente diminuição no número de fêmeas nascidas a cada 100 inseminações (média de 34 fêmeas), quando comparado com a IA com sêmen convencional do mesmo touro (taxa média de prenhez de 70% e nascimento de 35 fêmeas a cada 100 IA) (BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; MEIRELLES et al., 2008; SEIDEL & SCHENK, 2008; BORCHERSEN & PEACOCK, 2009; UNDERWOOD et al., 2010);

b) na PIVE, também ocorre baixa taxa de prenhez (média de 27%) que acarreta a produção de apenas 3 fêmeas a cada 100 oócitos fecundados quando comparado com o sêmen convencional que permite 40% de prenhez e 5 fêmeas nascidas a cada 100 oócitos fecundados (WILSON et al., 2005, 2006; XU et al., 2006; XU & DU, 2009; BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2010a);

c) o custo elevado da dose do sêmen sexado devido ao alto custo de produção (WEIGEL, 2004; De VRIES et al., 2008).

A centrifugação em gradiente de densidade (BR PI 0300604-2, 2003; AR P 040100475, 23 Fev. 2004; AT PCT/BR2004/000009, 11 Fev. 2004) é capaz de produzir 144 doses por hora, a cada centrífuga utilizada durante o processo, com pelo menos 12 milhões de espermatozóides recuperados com viabilidade de 50% após a descongelação, sendo que 63 a 68% são espermatozóides X, a um custo de R\$ 6,25 por dose.

Outra vantagem importante para a indústria da PIVE que é atendida por essa patente é a possibilidade da sexagem de sêmen convencional descongelado. Nesse caso substitui-se, durante o processo da PIVE, a técnica a seleção dos espermatozóides viáveis pelo gradiente de sexagem. Essa substituição possibilita obter dois benefícios ao mesmo tempo após a centrifugação no gradiente de densidade para sexagem: seleção dos espermatozóides viáveis e seleção de 65%, em média, de espermatozóides X, sem diminuir significativamente a taxa de prenhez.

A técnica de citometria de fluxo não proporciona os mesmos benefícios que a centrifugação em gradiente de densidade devido a dois fatos:

a) o citometro de fluxo produz apenas 7 doses (contendo 2,5 milhões) por hora (200 doses a cada oito horas)

b) os espermatozóides descongelados (sêmen convencional) têm a viabilidade diminuída significativamente quando são sexados pela citometria de fluxo (UNDERWOOD et al., 2010). A utilização de espermatozóides descongelados diminui a eficiência de sexagem, pois o processo de congelação prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos, com Hoechst 33342 e a viabilidade espermática (JOHNSON et al., 1994).

Existem touros cujo sêmen *in natura* não resiste ao processo de sexagem por essa técnica (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007) ou produzem variações nas taxas de clivagem (0 a 89%) e blastocistos produzidos (3,5 a 28,8%) (PALMA, et al., 2008), indicando que a citometria de fluxo compromete a capacidade fecundante dos espermatozóides (RATH et al., 2009). Portanto, tem-se estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos de sexagem de espermatozóides (DE JONGE et al., 1997; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; CESARI et al., 2006; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; CURRY et al., 2009; ALEAHMAD et al., 2009). Assim, tomando como exemplo os Estados Unidos e considerando a produção de “sêmen sexado” de todos os citômetros existentes no país isso representa menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado (WEIGEL et al., 2004).

2.2. Importância da seleção do sexo no melhoramento genético animal

As tecnologias da reprodução têm como objetivo aumentar a eficiência reprodutiva nos mamíferos. Isto significa que poucos progenitores e progenitoras seriam escolhidos para produzir um dado número de descendentes, quando comparado com os sistemas convencionais de reprodução. Geneticamente, isto resultaria em aumento da intensidade de seleção e, conseqüentemente, em aumento do mérito genético médio da progênie.

Demonstrou-se por modelos teóricos (simulações) que quando a tecnologia da reprodução era utilizada sobre uma base recorrente em uma população fechada, a taxa de melhoramento genético aumentava entre as gerações. Esta tem sido considerada a principal vantagem genética oferecida pelas tecnologias reprodutivas (NICHOLAS, 1996).

É importante ressaltar que também existem desvantagens no uso destas tecnologias já que elas poderiam aumentar a endogamia e diminuir a variabilidade genética. Neste aspecto, seria importante considerar em que sistema de produção essas tecnologias seriam utilizadas e a qual sistema de reprodução (inseminação artificial, transferência de embrião) estaria associado.

A seleção do sexo de espermatozoides e embriões permitiria o aumento do número de indivíduos de um dos sexos (masculino ou feminino) na progênie de uma população e incrementaria a intensidade de seleção ou a produção para aquele sexo, em detrimento do outro (BEKMAN et al., 1994; HOSSEIN-ZADEH et al., 2010).

Nas raças especializadas para a produção de leite, a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino é um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção. O progresso genético poderá ser maximizado em programas de criação para a produção de leite em que a proporção sexual é controlada por ocasião da inseminação artificial, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (VAN VLECK et al., 1987; HOHENBOKEN, 1999, HABERMANN et al., 2005; HOSSEIN-ZADEH et al., 2010). Entretanto, esses autores salientam que os benefícios serão observados somente se as técnicas de seleção do

sexo não diminuam a eficiência reprodutiva (por exemplo, taxas de prenhez devem ser mantidas superiores a 60%).

VAN VLECK (1981), avaliando sistemas de produção de leite, relatam que a utilização de teste de progênie e a utilização de touros provados como doadores de sêmen promovem um ganho genético anual de 2,0 a 2,5%. A utilização de touros jovens provenientes dos programas MOTE no teste de progênie aumentou o progresso genético para 15% ao ano (Petersen & Hanson, 1997, citados por DEMATAWEWA & BERGER, 1998). Quando se utilizou, além de MOTE, doses de sêmen enriquecidas com cromossomo X para a produção de novilhas que seriam selecionadas para progenitoras da próxima geração de fêmeas, esse ganho atingiu até 30%. Em um teste de progênie convencional, e que utilizasse sêmen enriquecido para produzir acima de 70% de fêmeas, seria possível conseguir um aumento de 25% no ganho genético anual (VAN VLECK, 1981).

Apesar das estimativas do aumento do ganho genético, as técnicas de seleção do sexo de embriões não são utilizadas em larga escala nos programas de melhoramento genético animal. Isto se deve ao fato de que as metodologias de sexagem disponíveis para uso comercial comprometem a capacidade fecundante dos espermatozoides e resultam em taxas de prenhez inferiores a 60% e taxas de blastocisto inferiores a 35% (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2011a).

Nos Estados Unidos, resultados de um teste de campo compararam as taxas de prenhez conseguidas com espermatozoides sexados por citometria de fluxo, em rebanhos com baixa, média e alta eficiência reprodutiva. A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional foi de 58%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozoides sexados nesses rebanhos as taxas de gestação foram 21, 37, e 35%, respectivamente (WILSON et al., 2005).

Na Finlândia, outro teste de campo (em uma cooperativa de produção de leite) comparou as taxas de prenhez conseguidas com espermatozoides sexados por citometria de fluxo (foram utilizadas 157 doses) e com sêmen convencional (foram utilizadas 149 doses). A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional foi de 46%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozoides

sexados nesses rebanhos a taxa de gestação foi 21%. Assim nasceram mais bezerras após a IA com sêmen convencional (33 bezerras) do que como sêmen sexado (27 bezerras) (ANDERSSON et al., 2006). Considerando esses resultados, torna-se evidente que os espermatozóides sexados por citometria de fluxo comprometem a taxa de gestação, pelo menos atualmente, e estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen deveriam ter como foco caminhos para se obter um benefício efetivo, incluindo a idade à primeira parição, frente ao custo de utilização (WEIGEL, 2004).

2.3. Citometria de fluxo

A quantidade de DNA entre os 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 de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON e WELCH, 1999). Essa diferença é cerca de 4,0 % mais DNA para os espermatozóides portadores do cromossomo X, e foi constatada em várias espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994).

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento e pela baixa produção/equipamento/hora, que não ultrapassa 12×10^6 espermatozóides em alta velocidade de separação (JOHNSON & WELCH, 1999) restringindo consideravelmente, sua utilização na indústria da inseminação artificial. Outros fatores limitantes são:

- a) o baixo número de espermatozóides sexados viáveis;
- b) a longa exposição ao corante sob alta temperatura (37°C);
- c) a necessidade de utilizar sêmen *in natura*, já que ocorre a diminuição da eficiência de sexagem de espermatozóides descongelados, devido ao fato da congelação prejudicar a uniformidade da coloração dos núcleos, com o corante Hoechst 33342 (JOHNSON et al., 1994), restringindo assim, a utilização de alguns dos melhores touros (touros provados), dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a PIVE;

d) diminuições nos parâmetros de fertilidade avaliados na PIVE (BEYHAN et al., 1999).

Em bovinos, os resultados de fertilidade a campo utilizando os espermatozóides sexados por este método demonstram índices similares comparados à utilização de espermatozóides não sexados, porém em condições experimentais e estritamente controladas, o que inclui a execução e supervisão da inseminação artificial por profissionais (técnicos e médicos veterinários) (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

O sêmen sexado por citometria de fluxo tem um grande impacto nos programas de melhoramento genético. O alto custo e as reduzidas taxas de prenhez, especialmente para a IA, limitam a aplicação desta tecnologia em animais de produção (CARVALHO et al., 2010). A eficiência da PIVE com sêmen sexado está sendo aperfeiçoada, apresentando taxas de blastocisto superiores a 45% (UNDERWOOD et al., 2010), mas outros estudos observam em média, 25% (PUGLISE et al., 2006; BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2008; BLONDIN et al., 2009; BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2010a).

A utilização de sêmen sexado em programas de inseminação artificial apresenta taxa de gestação de 21% (ANDERSSON et al., 2006). Esses autores obtiveram 46% de gestação após a inseminação artificial com sêmen convencional. Na produção *in vitro* de embriões obtém-se 45% de prenhez utilizando sêmen convencional, com a utilização de sêmen sexado, sem submetê-los à congelação, obtém-se 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento (GUTHRIE et al, 2002).

Um exemplo deste fato foi um estudo realizado na Suíça, no qual espermatozóides descongelados e sexados por citometria de fluxo e espermatozóides não sexados (dois milhões/dose) foram depositados no corpo do útero de novilhas e vacas. A taxa média de prenhez conseguida com espermatozóides sexados foi de 29,6% e 23,8%, para novilhas e vacas, respectivamente, enquanto que utilizando espermatozóides não sexados as taxas foram 59,3% para novilhas e 26,6% para vacas, verificados aos 70 a 90 dias após a inseminação artificial (BODMER et al., 2005). Neste mesmo estudo, foi constatada uma maior perda embrionária comparada com o controle, quando se utilizaram espermatozóides sexados por citometria, alcançando um índice de

11,1% em novilhas e 15,8% em vacas, e em contraste, utilizando-se espermatozóides não sexados, o índice foi de apenas 2,9% em vacas e de 0% em novilhas.

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos foram utilizados oócitos de 104 vacas de alto mérito genético e alto desempenho fenotípico. Os ovários foram coletados após o abate, foram aspirados e os oócitos inseminados com sêmen sexado por citometria de fluxo de três touros da raça Holandesa, que estavam sendo submetidos ao teste de progênie. Após sete dias de cultivo, os embriões foram transferidos para vacas controle (sem sincronização hormonal) e vacas sincronizadas pelo protocolo Ovsynch. As taxas de prenhez obtidas foram de apenas 16,3% para fêmeas do grupo controle e 20% para fêmeas sincronizadas com o protocolo Ovsynch (WILSON et al., 2005).

Os tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta), a baixa motilidade, baixas porcentagens de células com membrana intacta e acrossoma intacto aparentemente não impedem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, mas esses efeitos deletérios podem se manifestar somente em estágios tardios de desenvolvimento (após a formação do blastocisto) o que explicaria as baixas taxas de gestação (CARVALHO et al., 2010).

Os embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria de fluxo apresentam uma alta proporção de mitocôndrias imaturas e membranas nucleares danificadas (PALMA et al., 2008) e expressão reduzida de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (MORTON et al., 2007). Essas diferenças poderiam explicar as altas taxas de perda embrionária nos períodos de 30 a 90 dias de gestação, quando o sêmen sexado é utilizado para IA (BODMER et al., 2005; UNDERWOOD et al., 2010).

BERMEJO-ÁLVAREZ et al. (2010a) avaliaram os efeitos do sêmen sexado no desenvolvimento embrionário e na abundância de transcritos de genes candidatos (GSMT3, DNTM3A, PGRMC1, TP53, BAX, COX2, IGF2R, AKR1B1e PLAC8) para o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, concluíram que não houve diferença significativa no desenvolvimento de embriões (estágio de blastocisto) produzidos com sêmen sexado, comparando-se com o sêmen

convencional, mas observaram uma redução na taxa de clivagem dos embriões produzidos com sêmen sexado. Em relação à abundância de mRNA, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, para os nove genes avaliados.

MORTON et al. (2007), avaliaram os danos causados na expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*, utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão padrão do mRNA em importantes genes indicativos do metabolismo (Glut-3), estresse oxidativo (G6PD), estresse térmico (Hst) e inativação do cromossomo X (Xist). Observou-se redução na fertilidade *in vitro*, ou seja, diminuição nas taxas de clivagem e blastocistos, e redução na abundância de transcritos dos genes avaliados em embriões produzidos com sêmen sexado comparados com embriões produzidos com sêmen convencional. Os autores concluíram que o sêmen sexado por citometria de fluxo retardou o desenvolvimento embrionário e alterou o padrão de expressão gênica.

2.4. Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação em gradiente de densidade baseia-se na diferença de densidade entre essas duas populações de espermatozóides. A análise da cabeça dos espermatozóides por microinterferometria demonstrou que os espermatozóides X contêm mais DNA e proteína nuclear que os espermatozóides Y e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. 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% da densidade em relação a um espermatozóide X (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999).

Em bovinos, desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll com acuidade de cerca de 73%. Quando utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; 2003; 2011a). O aprimoramento deste método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ e Iodixanol™,

principalmente, no que se refere à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides.

Na espécie humana, o uso de centrifugação em gradiente de densidade com Percoll™, tanto para sexagem como para separação de espermatozóides viáveis para procedimentos como IA e PIVE, apesar de satisfatórios, permitindo um alto nível de resolução, foram abandonados. Na espécie humana, o Percoll™ teve o seu uso proibido devido ao aparecimento de endometrite nas mulheres inseminadas com sêmen previamente centrifugado em gradiente de densidade composto por meios coloidais cuja composição contém sílica (MAKKAR et al., 1999).

Em projetos anteriores, demonstrou-se que fêmeas bovinas não tiveram sua fertilidade (taxa de prenhez de 80%) comprometida após inseminação com espermatozóides tratados com Percoll™ (BR PI 0300642, 17 de junho de 2003).

Verificou-se posteriormente, que espermatozóides provenientes de sêmen *in natura* ou sêmen congelado, de várias raças de bovinos separaram espermatozóides X com acuidade média de 65%, quando esses espermatozóides foram utilizados para a produção de cerca de 10.000 embriões *in vitro*. A taxa de clivagem foi de cerca de 80% e a taxa de desenvolvimento embrionário de cerca de 30% e até 68% de embriões do sexo feminino (LUCIO, 2007; RESENDE et al., 2010a; RESENDE et al., 2010b; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2011a). Quando o sêmen sexado foi utilizado em cerca de 200 inseminações artificiais verificou-se 70% de taxa de prenhez e até 70% de fêmeas nascidas (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

2.5. Expressão gênica de embriões bovinos

O desenvolvimento de blastocisto é somente o primeiro passo ao longo de toda a trajetória para a produção de uma cria viável, por isso, aumentar as taxas de sucesso na produção *in vitro* de embriões (número de oócitos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto) é essencial para que os embriões que alcancem esse estágio *in vitro* sejam de melhor qualidade para assegurar ótimas taxas de prenhez (LONERGAN et al., 2003).

A qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* é inferior à qualidade dos embriões produzidos *in vivo*. Os embriões produzidos *in vitro* possuem um citoplasma escuro e uma baixa densidade flutuante (POLLARD & LEIBO, 1994), como conseqüência de seu alto conteúdo de lipídio (ABD EL RAZEK et al., 2000), zona pelúcida frágil (DUBY et al., 1997), reduzida expressão de dispositivos de comunicação intracelular (BONI et al., 1999), diferenças no metabolismo (KHURANA & NIEMMAN, 2000; TOMPSON, 2000) e alta incidência de anormalidades cromossômicas (LONERGAN et al., 2004) e muitas diferenças em níveis ultraestruturais têm sido descritas (CROSIER et al., 2001; FAIR et al., 2002; CROSIER et al., 2002; RIZOS et al., 2002a; PALMA et al., 2008).

A produção *in vitro* de embriões bovinos é essencialmente um processo que envolve três passos; a maturação *in vitro* do oócito, a fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro*. Em termos de eficiência em bovinos, aproximadamente 90% dos oócitos imaturos, geralmente recuperados de folículos em estágios desconhecidos do ciclo estral, passam pela maturação nuclear *in vitro*, de prófase I para metáfase II (estágio em que os oócitos são ovulados *in vivo*); em torno de 80% dos oócitos são fecundados e clivam pelo menos uma vez, chegando ao estágio de duas células; em torno de 30-40% de todos os oócitos chegam ao estágio de blastocisto, podendo ser transferidos para uma receptora ou congelados (LONERGAN et al., 2006). Deste modo, a maior diminuição ocorre durante a última parte do processo, o cultivo *in vitro*, entre o estágio de 2 células até blastocisto, sugerindo que o cultivo de embrião pós fecundação é o período mais crítico do processo em termos de determinar a produção de blastocistos (LONERGAN et al., 2003; LONERGAN et al., 2006).

No cultivo pós-fecundação, além do meio de cultura, no qual o embrião cresce e se desenvolve, deve-se considerar também o número de embriões cultivados juntos, a proporção meio:embrião, a temperatura e a atmosfera gasosa (LONERGAN et al., 2006). Suportando esta afirmação, KNJIN et al. (2002) compararam a expressão gênica de blastocistos derivados de oócitos maturados *in vivo* ou de oócitos maturados *in vitro*, e não observaram diferenças na abundância de transcritos para os GLUT1 e HSP, sugerindo que a maturação não é o principal passo no processo de produção *in vitro* de

embriões que afeta a expressão gênica no embrião. Em outras palavras, usando oócitos provenientes de duas fontes, que diferem apenas no desenvolvimento da competência, cultivando prováveis zigotos sob as mesmas condições, produzem blastocistos de qualidade similar (LONERGAN et al., 2003; 2006).

O meio de cultivo do embrião pós-fecundação pode exercer um efeito dramático no padrão da expressão gênica, podendo resultar sérias implicações para a normalidade do blastocisto (LONERGAN et al., 2003). O controle preciso da expressão gênica durante a fase de pré-implantação do desenvolvimento é particularmente importante; muitos eventos importantes relacionados com o desenvolvimento ocorrem durante o período incluindo: a primeira divisão celular (LONERGAN et al., 1999), a ativação do genoma embrionário, quando o embrião deixa de ser dependente do RNA materno, derivado do oócito para expressar seu próprio genoma (MEMILI & FIRST, 1999), a compactação da mórula o que envolve o estabelecimento do primeiro íntimo contato entre as células no interior do embrião (BONI et al., 1999) e a formação do blastocisto envolvendo a diferenciação de dois tipos de células, o trofoblasto e as células da massa interna (WATSON, 1992).

A qualidade do embrião pode ser expressa por diferentes parâmetros, assim como sua morfologia, criotolerância, metabolismo e expressão gênica. O padrão de expressão de uma série de genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é um parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (DODE et al., 2006) e quando este padrão está alterado, o desenvolvimento do embrião é comprometido até o estágio de blastocisto (BADR et al., 2007), proporcionando a ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in vitro* sejam desprovidos de potencial para criopreservação, transferência e implantação (WRENYCKI et al., 2004).

Como citado anteriormente, alterações no sistema de cultivo *in vitro* ou nas condições de cultivo, como a suplementação com diferentes componentes, podem acarretar em alterações nos níveis de expressão de mRNA, tornando-os mais ou menos expressos, ou acarretando a ausência de expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (WRENYCKI et al., 2004).

2.6. Genes candidatos para qualidade embrionária

2.6.1. Genes associados ao reconhecimento da gestação e formação da placenta

2.6.1.1. AKR1B1 e COX2

Prostaglandinas (PGs) são mediadoras das funções do sistema reprodutivo feminino, como por exemplo, ovulação, fecundação, implantação, manutenção da gestação e parto prematuro (BRESSION et al., 2011). As PGs são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA) e convertido em Prostaglandina H₂ (PGH₂), o precursor comum de todas as prostaglandinas, pela ciclooxygenase tipo 1 (COX1) ou tipo 2 (COX2) (SAINT-DIZIER et al, 2011).

PGH₂ produzida por COXs é o precursor comum de todas as PGs geradas por sintases específicas, assim como PGF sintase (PGFS) para PGF_{2α} e a PGE sintase (PGES) para PGE₂ (BRESSION et al., 2011).

AKR1B1 (aldose redutase 1)

PGF_{2α} está envolvida em vários processos fisiológicos incluindo regulação da pressão do olho (CRAWFORD & KAUFMAN, 1987), vasoconstrição e filtração renal (WEBER, 1980). Está associada a doenças como diabetes (MEZZETTI, 2000), osteoporose (MA et al., 1995; SOPER et al., 2001) e desordem menstrual (POYSER, 1995). No entanto, é muito mais conhecido o seu efeito no sistema reprodutivo feminino. Em mamíferos a produção de PGF_{2α} pelo útero está envolvida na regulação do ciclo ovariano (MADORE et al., 2003). Esta prostaglandina atua no corpo lúteo, iniciando sua regressão (luteólise) levando ao término do ciclo estral ou da gestação (McCRACKEN et al., 1999).

A biosíntese de PGF_{2α} ocorre pela redução de PGH₂ por 9,11-endoperóxido redutase (refere-se como atividade de PGFs) (MADORE et al., 2003). No endométrio de

bovinos, observamos uma forte associação entre AKR1B5, recentemente nomeada como AKR1B1, e a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a qual é uma nova função para esta enzima, previamente conhecida como 20α -hidroxiesteróide dehidrogenase e ativadora do metabolismo da glicose (POYSER, 1995). AKR1B1 pertence a superfamília aldo-keto reductase (AKR) que contem mais 114 proteínas, as quais são expressas em procariotas e eucariotas (LAMBERT-LAMGLAIS et al., 2009).

Em humanos AKR1B1 é altamente expressa na placenta para o metabolismo da glicose, no olho e no rim para a regulação osmótica (SRIVASTAVA et al., 2005), sendo também, associada à produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células endometriais (CHAPDELAINÉ et al., 2006). Em bovinos a atividade desta enzima pode ser observada na placenta e é altamente expressa no endométrio no momento da luteólise (MADORE et al., 2003), sugerindo que a expressão deste gene pode estar relacionada com falhas na gestação (EL-SAYED et al., 2006). Com base nessas afirmações, estudos feitos em biópsias de embriões bovinos produzidos *in vitro*, demonstram que aqueles que apresentavam elevada expressão de AKR1B1, resultaram em não gestação e reabsorção fetal (EL-SAYED et al. 2006).

COX 2 (ciclooxigenase tipo 2)

PGs são mediadores celulares parácrinos/autócrinos, que compartilham um precursor comum, PGH_2 , a qual é sintetizada a partir de AA livre pela ação de COX 1 ou COX 2 (LAMBERT-LANGLAIS et al., 2009). PGH_2 é então convertida em PGE_2 pela atividade de PGE sintase (PGESs) (SAINT-DIZIER et al., 2011). Duas dessas sintases são enzimas ligadas a membrana: mPGES-1 é uma proteína perinuclear induzida por estímulos pró-inflamatórios e predominantemente ligada a enzima COX 2; e mPGES-2 é expressa como proteína de membrana associada ao complexo de Golgi sendo funcionalmente ligada as enzimas COX 1 e COX 2 (KUDO & MURAKAMI, 2005).

COX 2 é induzida por diversos estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, promotores tumorais, regula a inflamação, a diferenciação e a angiogênese (GINGER et al., 1999). A enzima COX 2 desempenha um papel importante em eventos

reprodutivos, como a ovulação (SIROIS e DORE, 1997), luteólise (AROSH et al., 2002), alongação embrionária (WILSON et al., 2002) e implantação (SCHERLE et al., 2000), como também no término da gestação (ZHANG et al., 1996).

PGE₂ desempenha um importante papel na manutenção da gestação em vacas (SAINT-DIZIER et al., 2011). Embriões bovinos coletados entre os dias 6 e 10 após o acasalamento (mórula a blastocistos eclodidos) em vacas de corte, metabolizavam AA primeiramente em PGE₂ (HWANG et al., 1988). Após a eclosão, blastocistos alongados aumentam consideravelmente a secreção de PGE₂ durante o período de reconhecimento da gestação (dias 10 a 18 após o acasalamento) (HWANG et al., 1988).

PGE₂ também mostra um papel crucial no transporte e passagem de embriões eqüinos do oviduto para o útero (STOUT & ALLEN, 2001), na eclosão de blastocistos ovinos e de camundongos (SAYRE & LEWIS, 1993), na implantação de embriões de camundongos (PAKRASI & JAIN, 2008) e na expansão e competência de blastocistos bovinos (SAINT-DIZIER et al., 2011).

2.6.1.2. IGF2R

O sistema “insulin growth factor” (IGF) desempenha um papel chave na regulação do crescimento e desenvolvimento fetal (ALLAN, et al., 2001) e também no suprimento sanguíneo e formação da placenta (MÉO, 2005). Este sistema é composto por 2 ligantes o IGF1 e o IGF2, e dois subtipos de receptores, o IGF1R e o IGF2R (FARIN et al., 2010). Enquanto IGF1 tem sido reconhecido como o primeiro regulador do crescimento neonatal e pós-natal (GICQUEL e LE BOUC, 2006), ambos IGF1 e IGF2 desempenham um papel importante no crescimento pré-natal e desenvolvimento do feto (ALLAN et al., 2001; BOUER et al., 1998). As ações biológicas de ambos são mediadas pelo IGF1R (FARIN et al., 2010), em contraste, IGF2R não está associado com o sinal intracelular de transdução do sistema, e sua função é reduzir a disponibilidade de IGF2 (GHOSH et al., 2003).

O IGF2R é um gene “imprinted” e desempenha um papel negativo no crescimento fetal, pois promove a degradação de IGF2 (LAU et al., 1994; LUDWIG et al., 1996). Em embriões partenogênicos de ovelhas baixos níveis de expressão de IGF2 e altos níveis de IGF2R foram observados, bem como retardo no crescimento embrionário quando comparado com embriões do grupo controle (YOUNG et al., 2003). Contrariamente, a ausência de IGF2R em embriões ovinos produzido *in vitro* submetidos ao cultivo *in vitro* está associada a síndrome do bezerro gigante (YOUNG et al., 2001). Em bovinos, acredita-se que distúrbios nos genes IGF2, IGF2R sejam responsáveis pela síndrome do bezerro gigante (NIEMANN et al., 2002; RIZOS et al., 2002b), que ocorre em embriões produzidos *in vitro* e em animais clonados, cultivados na presença de soro (MOORE e REIK, 1996; YOUNG e FAIRBURN, 2000).

2.6.1.3. PLAC8 (proteína específica da placenta 8)

O sucesso da gestação em mamíferos está diretamente relacionado à própria função da placenta, o tecido especializado em conectar o embrião à mãe após a implantação (GALAVIZ-HERNANDEZ et al., 2003). Muitas desordens genéticas causam defeitos no desenvolvimento da placenta, como por exemplo, defeito de implantação, retardamento no crescimento intra-uterino e pré-eclampsia (CROSS et al., 1994).

PLAC8 foi primeiramente caracterizado em camundongos, e apresenta altos níveis de expressão em placenta e níveis reduzidos de expressão em embriões de camundongos (GALAVIZ-HERNANDEZ et al. 2003). Em embriões bovinos, PLAC8 é apresenta-se mais expresso em embriões que resultam em gestação em relação àqueles que resultam em absorção fetal (EL-SAYED et al., 2006). Existem relatos que em endométrio de vacas prenhes, PLAC8 é altamente expresso quando comparado com níveis de expressão em vacas não-prenhas (KLEIN et al., 2006), sugerindo que esta proteína desempenha um papel no desenvolvimento da placenta e no reconhecimento materno fetal (EL-SAYED et al., 2006).

2.6.2. Genes associados à resposta oxidativa (MnSOD e GPX1)

Espécies de oxigênio reativas (ROS, em inglês) são importantes moléculas (radicais livres superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio; OCHSENDORF, 1999), geradas a partir do metabolismo de células normais que podem ser tanto benéficas como prejudiciais para os organismos vivos (MATOS et al., 2009). Podem ser formadas por uma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna pelo próprio metabolismo celular ou por enzimas (BORGES, 2008).

Baixas concentrações de moléculas de ROS são essenciais para a maturação dos gametas, fecundação (MORADO et al., 2009) e proliferação celular (RAHIMI et al., 2003). No entanto, estudos demonstram que altas concentrações de ROS podem induzir o estresse oxidativo, o qual é responsável por causar danos na membrana e fragmentação do DNA em células somáticas, levando à apoptose celular (TATEMOTO et al., 2000).

Em embriões bovinos, ROS induz efeitos prejudiciais, como danos no DNA das células, peroxidação lipídica e modificação oxidativa em proteínas (JOHNSON et al., 1994), causando redução da qualidade embrionária e baixas taxas de implantação (SEINO et al., 2002). BEDAIWY et al. (2004) demonstraram que altos níveis de ROS em meios de cultivo estão associados a baixas taxas de desenvolvimento embrionário e de formação de blastocistos.

Em espermatozoides, ROS causam peroxidação de lipídeos, o que leva a danos irreversíveis na membrana, principalmente no acrossoma, prejudicando a motilidade do espermatozoide e também a reação acrossomal (WHITTINGTON e FORD, 1998), o que pode implicar baixas taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário.

As células possuem um eficiente sistema de proteção capaz de minimizar os efeitos maléficos dos radicais livres, através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (ABEDELAAHI, et al., 2010). No sistema enzimático, diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo, dentre elas, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPX) (BORGES, 2008).

Superóxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes, que exercem um efeito imediato e altamente eficiente em remover o anion superóxido (O_2^-), convertendo-o em peróxido de hidrogênio, existindo duas isoformas presentes nas células: o manganês-SOD (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial (PANI & GALIOTTI, 2011) e o Cobre/Zinco-SOD (CuZnSOD), localizada no citoplasma (MATOS et al., 2009).

As GPX são antioxidantes que fornecem proteção contra danos causados por estresse oxidativo pela redução de hidroperóxidos de lipídeos em álcool não reativos e redução de peróxido de hidrogênio em água (MISTRY et al., 2010). Várias formas de GPX são encontradas em vertebrados: a GPX celular e citosólica (GPX1), a citosólica gastrointestinal (GPX2), a plasma extracelular (GPX3) e a GPX fosfolipídeo hidroperóxido (GPX4) (BRIGELIUS-FLOHE, 1999).

2.6.6. Gene associado ao metabolismo celular (SCL2A1)

Glicose é um importante substrato energético para o desenvolvimento de embriões bovinos, particularmente durante período de pós-compactação (LEESE, 1995). Após entrar nas células embrionárias via transportadores de glicose (SCL2A1), a glicose pode ser metabolizada pela via glicolítica ou pela via pentose fosfato (LOPES et al., 2007).

SCL2A1 pertence à família de facilitadores de transporte de glucose, e muitos estudos relatam que pode estar expresso em ovário de ovelhas (WILLIAMS et al., 2001), em ratos (KOL et al., 1997; KODAMAN e BEHRMAN, 1999) e camundongos (ZHOU et al., 2000) com consideráveis diferenças no padrão de expressão entre espécies, SCL2A é regulado por fatores intraovarianos envolvidos no desenvolvimento folicular, maturação e ovulação (NISHINOTO et al., 2006), assim como estradiol (E2), IGF-I e interleukina-I (KOL et al., 1997, ZHOU et al., 2000) bem como as gonadotrofinas (reguladoras da função ovariana) (KODAMAN e BEHRMAN, 1999).

Os níveis de expressão de SCL2A1 são detectados após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (WRENZYCKI et al., 2005) e também são significativamente mais elevados em células do trofoblasto do que em células da massa celular interna de

embriões bovinos (WRENZYCKI et al., 2003). No entanto nas células do trofoblasto, SCL2A1 é encontrado apenas nas membranas laterais (LOPES et al., 2007).

A expressão de SCL2A1 aumenta com o incremento da absorção de glicose pelo embrião (WRENZYCKI et al., 1999). Condições de cultivo *in vitro*, como a tensão de oxigênio (KIND et al., 2004) e os níveis de glicose no meio de cultura (KIMURA et al., 2005) podem afetar o padrão de expressão deste gene, sendo menos expressos em embriões produzidos *in vitro*, quando comparados com aqueles produzidos *in vivo* (WRENZYCKI et al., 2001; KNIJN et al., 2002).

Durante a compactação e blastulação o metabolismo da glicose aumenta substancialmente (THOMPSON, 2000). Também seu metabolismo é mais elevado em embriões morfológicamente normais, quando comparados com aqueles que apresentam estruturas degeneradas (RIEGER, 1984) e em embriões viáveis capazes de serem transferidos a uma receptora (LANE e GARDNER, 1996; GARDNER et al., 2007).

2.6.7. Gene associado a apoptose celular (TP53)

Uma das características da PIVE em mamíferos é a alta frequência de falhas no desenvolvimento inicial (FAVETTA et al., 2004). Em bovinos, menos da metade dos embriões produzidos *in vitro* se desenvolvem até o estágio de blastocisto (XU et al., 1992) e muitos destes não se implantam após a transferência para uma receptora (BETTS e KING, 2001). As razões para estas altas taxas de falhas no desenvolvimento inicial ainda não foram elucidadas.

Células com características apoptóticas, como fragmentação do DNA, fragmentação citoplasmática e nuclear, têm sido detectadas em embriões que se desenvolvem e naqueles que possuem seu desenvolvimento anormal, sugerindo que a apoptose é um mecanismo essencial para remover células não desejadas durante o desenvolvimento normal (HARDY, 1999) e, também, pode desempenhar um papel importante no impedimento do crescimento embrionário (HARDY, 1997; KAMJOO et al., 2002).

A proteína tumoral p53 (Tp53) é crítica para a sensibilidade do embrião ao estresse (tensão de oxigênio, temperatura, componentes do meio de cultivo) pelo meio e regula a diferenciação durante o desenvolvimento embrionário (LICHNOVSKY et al., 1998). Em estudos utilizando blastocisto de camundongos, detectou-se altos níveis de p53 na massa celular interna, sugerindo que a p53 é essencial para auxiliar nos mecanismos de apoptose celular (JURISICOVA et al., 1998) e embriões com deficiência em p53, as taxas de apoptose celular eram consideravelmente menores (FRENKEL et al. 1999). A p53 ativa genes de reparo de danos no DNA de células e também induzir a apoptose celular pela ativação de genes alvos, como por exemplo, o pró-apoptótico BAX (STEWART e PIETENPOL, 2001).

2.7. O genoma paterno e o desenvolvimento embrionário

O espermatozóide é o veículo de entrega do complemento genético paterno para o óvulo, sendo esta entrega de material genético crucial para a embriogênese (BARROSO et al., 2009), mas muitos estudiosos têm mostrado que a contribuição do espermatozóide é muito maior do que só seu DNA (SUTOVSKY & SCHATTEEN, 2000; CUMMINS, 2001). O genoma de espermatozóides de mamíferos é composto por DNA nuclear, DNA mitocondrial (SUTOVSKY et al., 2003) e RNA mensageiros citoplasmáticos (MILLER, 2000).

Existe uma extensa comunicação entre o espermatozóide apto a fecundação e o oócito, levando à ativação do oócito e à descondensação do espermatozóide. Isto é seguido ordenadamente pela formação dos pró-núcleos feminino e masculino, singamia e clivagem (primeiras divisões celulares). Muitas estruturas, organelas e moléculas presentes no espermatozóide parecem ser críticas para a realização de uma fecundação normal e para o desenvolvimento embrionário.

Segundo BARROSO et al. (2009), o espermatozóide apto a fecundação é essencial para contribuição de pelo menos três componentes: o genoma haplóide paterno, a sinalização para iniciar a ativação metabólica do oócito, e o centríolo, que

direciona a montagem dos microtúbulos conduzindo a formação do fuso mitótico durante o desenvolvimento inicial do zigoto.

Uma fecundação bem sucedida é dependente de múltiplas qualidades inerentes aos oócitos (VAN BLERKON, 2000; SWAIN & POOL, 2008). Porém nas últimas duas décadas, várias linhas de pesquisas mostraram resultados, a partir do uso de técnicas de reprodução assistida, que fornecem um suporte inicial para o conceito da contribuição paterna para fecundação defeituosa e embriogênese anormal. Fortes evidências associadas à presença de parâmetros espermáticos anormais (teratozoospermia, dano por estresse oxidativo e fragmentação do DNA) resultam em falha ou atraso na fecundação e em desenvolvimento embrionário anormal (OEHNINGER et al., 1989; MERCAN et al., 1998; LIU et al., 2004; BARTOV et al., 2005; BARROSO et al., 2006).

O desenvolvimento embrionário é primeiramente dependente dos estoques de RNA mensageiros presentes nos oócitos, os quais são gradualmente exauridos até que o embrião produza os seus próprios transcritos. A expressão de genes paternos e a estabilidade do RNA em oócitos e em embriões em estágios iniciais de desenvolvimento são consideradas prioridades para a ativação da transcrição gênica embrionária (NIEMANN et al., 2007). O início da transcrição do genoma de embriões ocorre em um tempo espécie-específico; em camundongos, a ativação tem início em embriões com duas células; em suínos, em embriões com 4 células; em humanos, de 4 a 8 células; em bovinos essa ativação é atrasada até o estágio de 8 a 16 células (TELFORD et al., 1990; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000).

Nos sistemas de PIVE, a velocidade de desenvolvimento, especificamente o tempo da primeira divisão celular e o tempo de formação do blastocisto, tem sido relacionada à competência do desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 1999).

A expressão padrão de mRNA de vários genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é um parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (FARIN et al., 2004; DODE et al., 2006) e quando este padrão de expressão é alterado, pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário e a ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in*

vitro estejam desprovidos do potencial para sustentarem a transferência e implantação (WRENZYCKI et al., 2005).

Durante o processo de sexagem os espermatozóides estão expostos a muitos riscos potenciais (MAXWELL et al., 2004) os quais podem ser responsáveis por alguns efeitos deletérios, como alterações no DNA ocasionadas pelo corante Hoesch 33342 (MORREL & DRESSER, 1989; GARNER, 2009) alterações no padrão de motilidade espermática (SUH et al., 2005), viabilidade reduzida (HOLLINSHEAD et al., 2003), aceleração da reação acrossomal (MOCÉ et al., 2006), aumento na proporção de células que sofreram capacitação espermática (MAXWELL et al., 1998) e existem relatos que o uso de sêmen sexado por citometria de fluxo altera o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vivo* (McNUTT & JOHNSON, 1996) e *in vitro* (CRAN et al., 1993; LU et al., 1999). Portanto, a baixa qualidade e a baixa fertilidade dos embriões produzidos *in vitro* utilizando sêmen sexado podem ser conseqüências desses danos (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a).

Entretanto, o espermatozóide danificado pode ser capaz de fertilizar um oócito, mas acaba resultando em embrião de baixa qualidade (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2008). Alguns estudos relataram anormalidades em termos de abundância de mRNA ou alterações estruturais em embriões produzidos *in vitro* com espermatozóides sexados por citometria de fluxo (MORTON et al., 2007; PALMA et al., 2008).

FATEHI et al. (2006), investigando os efeitos de espermatozóides com danos no DNA no desenvolvimento embrionário, sugerem que no início da expressão gênica embrionária em estágios iniciais de desenvolvimento (estágio 4-8 células) os danos no DNA paterno tornam-se sensíveis ao mecanismo da apoptose do embrião, e pelo bloqueio da mitose, interrompendo o avanço no desenvolvimento embrionário. Isto é evidenciado pela falha na formação de blastocisto, fragmentação nuclear em corpos apoptóticos e falhas na formação do fuso meiótico.

A atividade de transcrição do blastocisto é mais alta que a detectada no estágio inicial de pré-implantação e, neste estágio, o genoma paterno tem um significativo papel na contribuição da função do embrião, é quando conseqüências das alterações no DNA

paterno podem suceder manifestações, prejudicando a implantação do embrião (PÉREZ-CRESPO et al., 2008).

Portanto, o diagnóstico do efeito paterno inicial é baseado na baixa qualidade morfológica de um zigoto e de um embrião, e na baixa velocidade de clivagem, e isto não está associado à fragmentação do DNA. O efeito paterno tardio, por outro lado, é manifestado pela baixa competência de desenvolvimento ocasionando falhas na implantação e isto está associado ao aumento da incidência de fragmentação de DNA na ausência de anormalidades morfológicas em zigotos e embriões nos primeiros estágios de clivagem (TESARIK et al., 2004; TESARIK, 2005). Sendo assim, os danos no DNA do espermatozóide afetam, unicamente, o desenvolvimento embrionário após o início da expressão gênica no embrião (FATEHI et al., 2006).

3. HIPÓTESE

De acordo com os relatos da revisão de literatura da presente tese e com os trabalhos realizados no laboratório de reprodução animal da FCAV/UNESP Jaboticabal, levantam-se as seguintes hipóteses:

- 1) A seleção do sexo de espermatozóides bovinos pela técnica de centrifugação em gradiente de densidade apresenta maiores taxas de clivagem e de desenvolvimento de blastocistos, quando comparada à técnica de citometria de fluxo.

- 2) A seleção do sexo de espermatozóides bovinos pela técnica de centrifugação em gradiente de densidade não altera o padrão de expressão de genes candidatos para a qualidade embrionária, quando comparada à técnica de citometria de fluxo.

4. OBJETIVOS

1) Comparar as taxas de clivagem e de desenvolvimento de blastocistos bovinos, produzidos *in vitro*, utilizando sêmen convencional, sexado por citometria de fluxo e sexado por centrifugação em gradiente de densidade;

2) Verificar a existência de diferenças no padrão da expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário em embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando sêmen convencional, sexado por citometria de fluxo e sexado por centrifugação em gradiente de densidade.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção dos espermatozoides e grupos experimentais

Para a realização deste experimento, foram utilizadas 20 doses de sêmen convencional de um touro da raça Gir Leiteiro, congelado por empresas especializadas que, pós-descongelação, foram submetidos à avaliação da concentração, motilidade e vigor. O sêmen sexado pelo método de citometria de fluxo, do mesmo touro, também foi adquirido em empresas especializadas.

Os grupos experimentais do presente trabalho foram:

- 1) grupo controle: sêmen convencional submetido ao gradiente de Percoll™ 45/90%;
- 2) grupo gradiente: centrifugação em gradiente de densidade (gradiente 14);
- 3) grupo citometria: sêmen sexado pelo citometro de fluxo, submetido ao mini gradiente de Percoll™ 45/90%.

5.2. Centrifugação em gradiente de densidade

5.2.1. Preparação dos gradientes descontínuos de densidade

A solução estoque (SE 90%) foi preparada diluindo-se 9 partes de sílica coloidal modificada (Percoll™ densidade 1,30 g/mL) em uma parte de DMEM (Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium) (densidade 1,058 g/mL; 1:9, v/v) concentrado 10 vezes (DMEM 10X) complementado com 0,01 g/L de antibiótico, 6 mM de HEPES; pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H₂O.

O DMEM 10X concentrado foi preparado diluindo-se em 100 mL de água ultrapura bidestilada do Sistema Milli Q, a quantidade de pó necessária para preparar 1 L. Em seguida, filtrava-se em membrana com poros de 0,22 µm e estocava-se em temperatura entre 4 a 6 °C, por no máximo 15 dias.

Para obter os gradientes descontínuos de densidade, soluções isotônicas (280-320 mOsm/Kg de H₂O) com densidades diferentes eram preparadas diluindo-se diferentes porções de SE (Percoll™ 90%) em meio DMEM 1X, complementado com antibiótico, 6 mM de HEPES e 0,3 a 0,6% de albumina sérica bovina fração V (BSA); pH 7,4. O DMEM 1 X foi preparado segundo instruções do fabricante. Em seguida, era filtrado em membrana com poros de 0,22 µm e estocado em temperatura entre 4 a 6 °C por, no máximo, 15 dias.

O gradiente descontínuo de densidade foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, as camadas de densidades diferentes de Percoll™, em tubos cônicos de poliestireno com o auxílio de pipeta de volume ajustável. Após a confecção dos gradientes, as amostras de sêmen foram descongeladas por 30 s a 37 °C e depositadas sobre o gradiente.

O gradiente 14 utilizado neste estudo, era composto por 3 camadas de 3 mL de soluções de Percoll™ com densidades variando entre 1,110 g/mL a 1,123 g/mL (BR PI 0300642, 17 de junho de 2003).

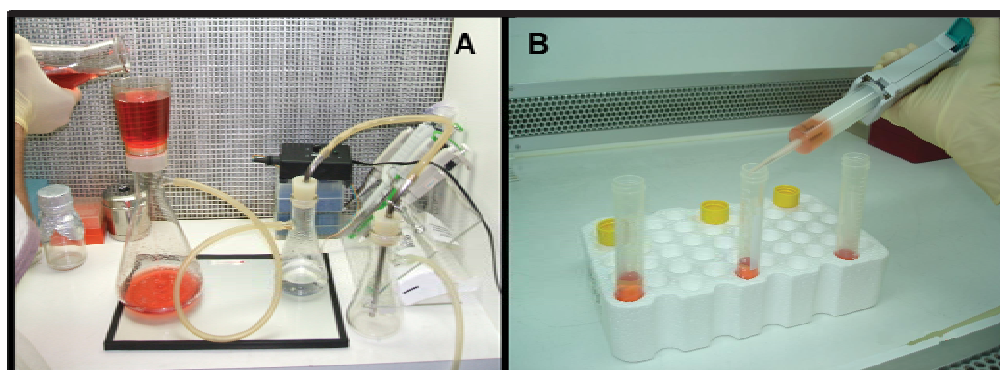


Figura 1. Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção do gradiente descontínuo de densidade - G14 (B)

5.2.2. Centrifugação e recuperação dos espermatozoides nos gradientes de sexagem

Quarenta milhões de espermatozoides ($80 \times 10^6/\text{mL}$) foram depositados sobre cada gradiente descontínuo de Percoll™. Os gradientes foram centrifugados a $500 \times g$ em rotor horizontal, por 15 minutos, a 22°C . Os sobrenadantes foram retirados concomitantemente com a adaptação de um sistema de vácuo (Vacusafe). Os sedimentos de espermatozoides foram recuperados com auxílio de uma micropipeta, e utilizados nos procedimentos de produção *in vitro* de embriões.

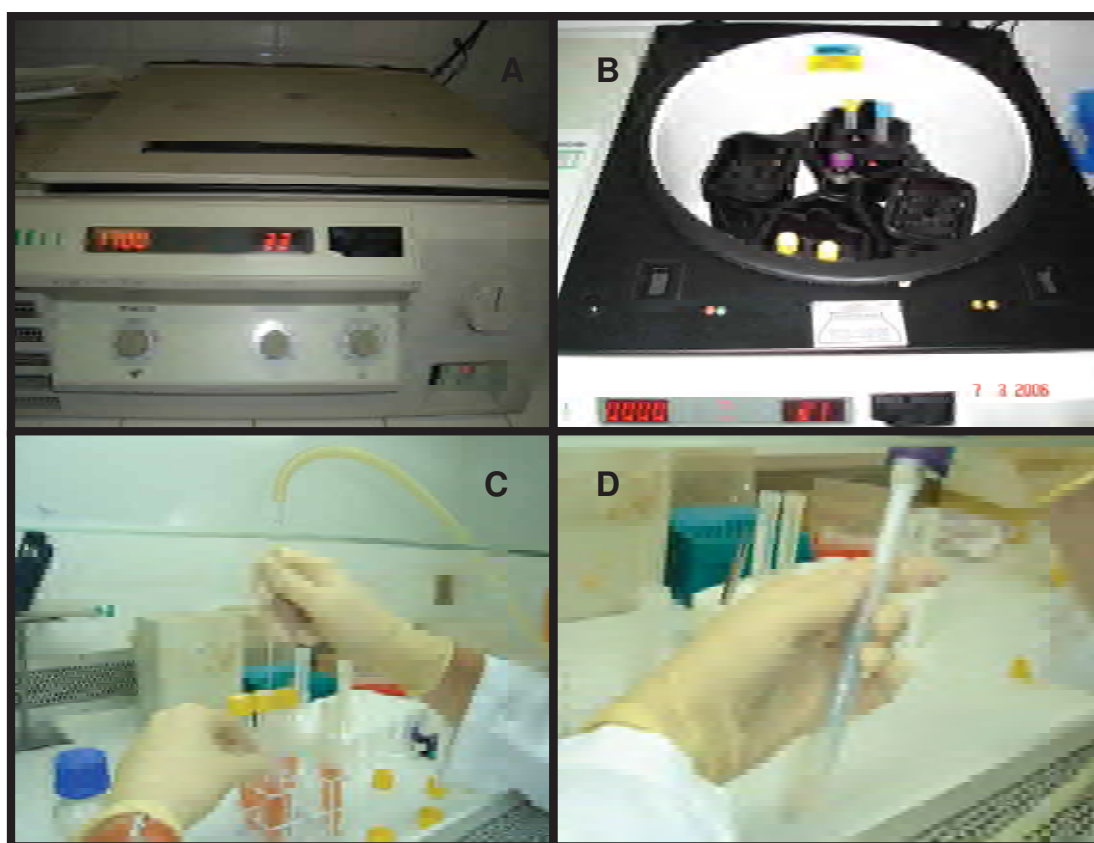


Figura 2: Centrifugação em centrífuga refrigerada de rotor horizontal (A e B); recuperação dos espermatozoides por um sistema á vácuo (C); recuperação do pelete (D).

5.3. Citometria de Fluxo (GARNER et al., 1983)

A seguir será descrita a técnica de citometria de fluxo utilizada nas centrais de inseminação artificial.

Para a sexagem por citometria de fluxo, os espermatozóides foram corados com Hoechst 33342 (concentração de 126 μM ; a 37°C por 1 hora). As células espermáticas foram colocadas no citômetro e passavam em fila única por um feixe de laser que emite 200 mW de luz ultravioleta em um comprimento de onda de 351 a 364 nm, que proporcionava emissão de fluorescência pelos espermatozóides. A fluorescência era captada por detectores conectados a um computador, e colocados a 0 e 90° da linha de emissão do laser.

Os espermatozóides que não estavam apropriadamente orientados produziam uma menor fluorescência (emitida pela extremidade da cabeça do espermatozóide) que era transmitida para o detector posicionado a 90° do laser, e foram, eletronicamente, eliminados do sistema, enquanto que a fluorescência captada pelo detector posicionado a 0°, em relação ao laser, era proveniente da face plana da cabeça do espermatozóide, que produzia o histograma bimodal originado da diferença de conteúdo de DNA entre os espermatozóides X e Y. O histograma bimodal foi gerado pelo processamento de um computador, com base nas informações provenientes dos detectores, que eram lentes ópticas que captavam e filtravam a fluorescência emitida pelos espermatozóides corados, convertendo este sinal óptico em um sinal eletrônico.

Ao final desta análise, o circuito carregou com carga positiva ou negativa, gotas contendo espermatozóide X e Y, respectivamente, mediante informações obtidas pela emissão da fluorescência de cada espermatozóide. Essas gotas carregadas eletricamente e geradas por ultra-som, contendo um ou mais espermatozóides, passavam por um campo eletrostático separando os espermatozóides em tubos coletores diferentes.

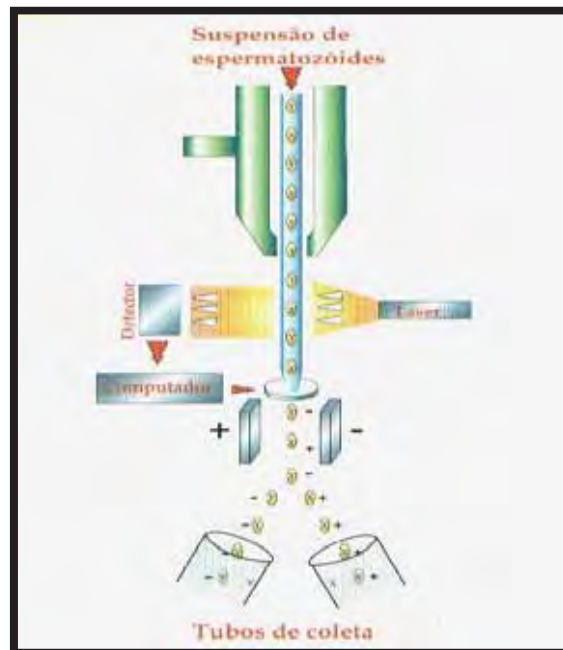


Figura 3: Esquema da sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo.

5.4. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões bovinos foi realizada segundo o protocolo utilizado pelo Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus Jaboticabal.

5.4.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos coletados em abatedouros foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-33 °C, e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 19-G acoplada à seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15 minutos para a separação dos oócitos (Figura 4). Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de

poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Foram selecionados apenas oócitos com células do *cumulus* (complexo *cumulus*-oócito, COCs) compacto com pelo menos quatro camadas de células e ooplasma de coloração uniforme (Figura 4).

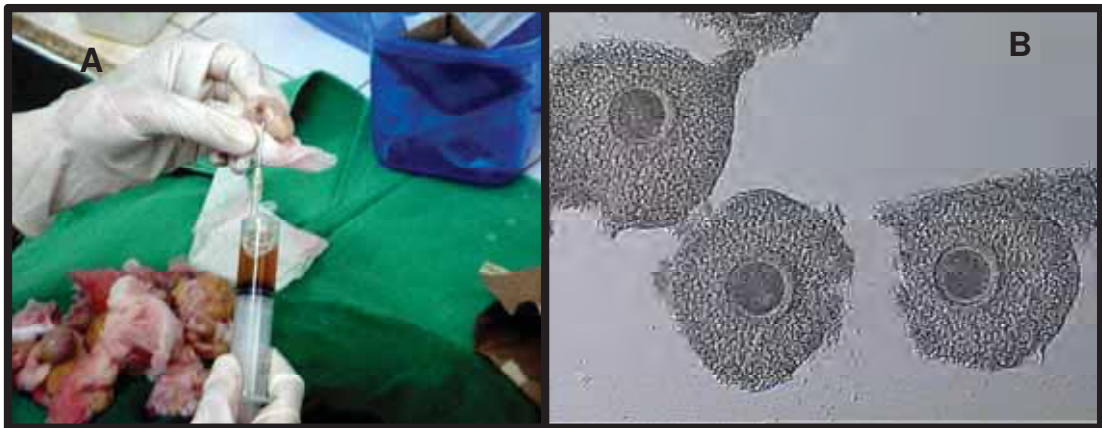


Figura 4: Aspiração de ovários de matadouro (A); oócitos grau 1 selecionados pós-aspiração para serem maturados *in vitro*.

5.4.2. Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB. Foram transferidas 20 estruturas/microgota de 100 µL. Os oócitos foram maturados (Figura 5) durante 22 a 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

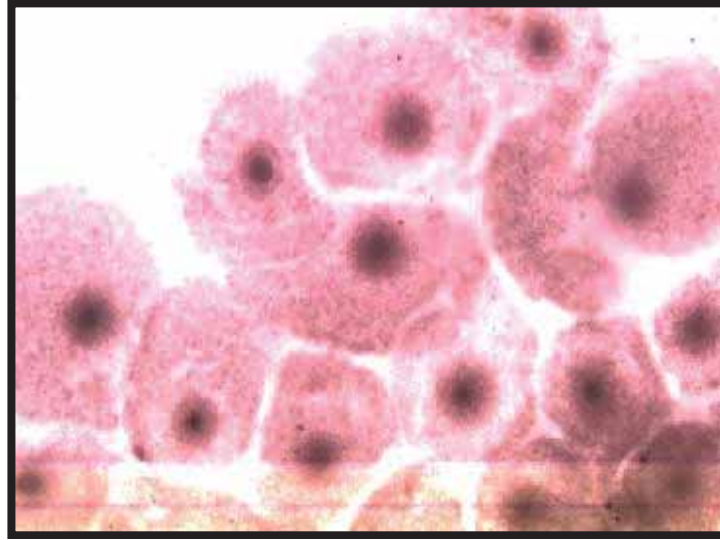


Figura 5: Oócitos bovinos maturados *in vitro* após aspiração de folículos de ovários provenientes de abatedouro.

5.4.3. Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 22 a 24 horas após o início do cultivo de maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35 °C por 30 segundos. No grupo controle o sêmen era depositado sobre o gradiente de Percoll™ (45% e 90%) à temperatura ambiente e centrifugado a 900 xg durante 30 minutos, a fim de sedimentar os espermatozóides viáveis. O sedimento espermático resultante desta centrifugação teve o volume medido. Foram retiradas duas amostras de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração, que era ajustada para 25000 espermatozóides com motilidade progressiva por µL. Aproximadamente 100×10^3 espermatozóides foram adicionados à cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV designado a cada grupo experimental. Para o grupo gradiente de densidade a FIV foi realizada segundo o item 5.2.2.

Para o grupo de espermatozóides sexados citometria de fluxo, uma palheta de sêmen sexado para fêmeas foi descongelada e submetida a um mini gradiente de Percoll 45/90%, o qual foi centrifugado a 900 xg por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e sobre o pélete foram adicionados 500 µL de meio TALP-FIV,

e procedeu-se uma centrifugação a 500 xg por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, deixando apenas 100 µL. Cada placa de FIV continha 5 gotas de 30 µL de meio TALP-FIV. Foram depositados em cada microgota 10 µL de meio contendo espermatozóides. A concentração espermática não foi determinada devido ao baixo número de espermatozóides existentes na palheta.

Foram adicionados 20 oócitos por gota de FIV, e foram incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A clivagem foi avaliada 48h após a FIV.

5.4.4. Desenvolvimento *in vitro*

O desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* baseou-se nos protocolos de VAJTA et al. (1999) e GUTIÉRREZ-ADÁN et al. (2001, 2004). Os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com 5 mg/mL de BSA, sem SFB e sem glicose e transferidos para placas com quatro poços contendo 500 µL do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fecundação. Foram cultivados 60 zigotos por poço, em estufa, com atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5 °C.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado sete dias após a fecundação.

As fases do desenvolvimento embrionário estão ilustradas na Figura 6.

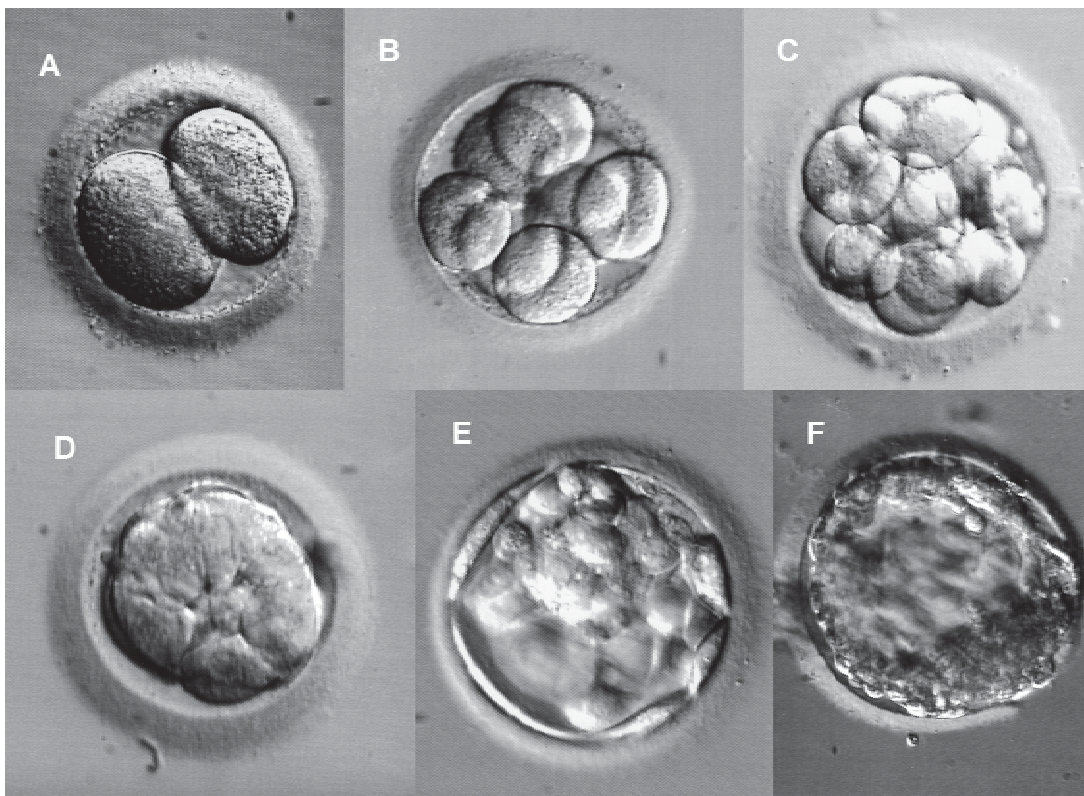


Figura 6: Desenvolvimento embrionário humano: embrião com 2 células (A); embrião de 8 células (B); embrião de 16 células (C); mórula (D); blastocisto (E); blastocisto eclodindo (F).

5.4.5. Forma de análise dos resultados para a PIVE

Os dados foram analisados usando o programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). As taxas de clivagem e blastocisto foram analisadas one-way ANOVA com o Teste Duncan para comparação de médias.

5.5. Expressão gênica de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado

5.5.1. Extração de RNA de embriões produzidos *in vitro*

Para a extração de RNA, os blastocistos foram coletados no dia 7 e 8 de desenvolvimento, lavados em PBS e colocados em grupos de 10 em tubos de 0,2 mL. A

extração de RNA foi realizada utilizando-se “Dynabeads mRNA Direct Extraction KIT” (DynaL Biotech, Oslo, Norway), segundo as instruções do fabricante com algumas modificações.

5.5.2. Transcrição Reversa

Imediatamente após a extração, a reação de transcrição reversa (RT) foi realizada, seguindo as instruções do fabricante (Bioline, Ecogen, Madri, Espanha), usando poli(T) “primer”, “random primers” e a enzima transcriptase reversa MMLV (Promega, Madri, Espanha).

Logo após a extração, a produção de cDNA foi obtida através de uma reação com um “mix” contendo 3 μ L “random primer” e 1 μ L poli(T) “primer”, o qual foi preparado e adicionado ao RNA extraído. Os tubos foram aquecidos por 5 minutos para desnaturar a estrutura secundária de RNA e então o mix para a reação de transcrição reversa (RT) foi preparado.

As amostras foram incubadas a 42 °C por 60 minutos, para permitir a transcrição reversa do RNA, seguida de uma incubação a 70 °C por 10 minutos para desnaturar a enzima RT.

5.5.3. PCR em Tempo Real (qPCR)

Para qPCR, três grupos de 10 embriões, por grupo experimental, foram usados em duas repetições para cada gene de interesse. Os experimentos foram conduzidos para normalizar os níveis relativos de cada transcrito com os níveis relativos do gene endógeno, histona H2AFZ (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008; 2010a), em cada amostra. Esta histona foi escolhida como gene referencia por ser altamente conservada em eucariotos (CREYGTON et al., 2008), e por se apresentar distribuída em todo o genoma, sendo confinada a pequenas regiões que iniciam a transcrição (ZHANG et al., 2005).

As reações de qPCR foram realizadas em um termociclador Rotor Gene 6000 (Cobertt Research, São Francisco, EUA). O perfil térmico utilizado foi: um passo inicial de 94 °C por 3 min seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 10 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 10 s e 10 s para aquisição da fluorescência. A especificidade dos “primers” foi avaliada pela curva de “melting” (temperatura de anelamento que é específica para cada “primer”, variando de 80 a 86 °C)

As reações de qPCR foram preparadas com um volume final de 20 µL contendo 2X o “mix” SYBR Green (Quantimix Easy Kit, Biotools, Madrid, Espanha), 10 pmol de cada “primer” e 2 µL de cDNA de cada amostra.

As sequências dos primers e os tamanhos dos produtos de amplificação estão demonstrados na Tabela 1. A eficiência dos “primers” foi testada anteriormente pela equipe que pesquisa do Laboratório de Embriologia Molecular e Trangenese, do INIA. Estas sequências de oligonucleotídeos foram usadas constantemente em muitos estudos desenvolvidos por esta equipe.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

Gene	Sequência dos Primers (5' – 3' "Forward" e "Reverse")	Tamanho fragmento (pb)	Número acesso Genebank
H2AFZ	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209	NM_174809.2
AKR1B1	CGTGATCCCCAAGTCAGTGA AATCCCTGTGGGAGGCACA	152	NM_001012519.1
COX2	ATCTACCCGCCTCATGTTCTT GGATTAGCCTGCTTGTCTGGA	187	AF031698
IGF2R	GCTGCAGTGTGCCAAGTGAAAAG AGCCCCTCTGCCATTGTTACCT	201	NM_174352.2
PLAC8	CGGTGTTCCAGAGGTTTTTCC AAGATGCCAGTCTGCCAGTCA	166	NM_001025325.1
TP53	CTCAGTCCTCTGCCATACTA GGATCCAGGATAAGGTGAGC	364	U74486
SCL2A1	CCTTGGAGGGATGGCTTTTTGTTT CGTGGCTGAGGGGAAGAGCAGTCC	259	L39214
MnSOD	GCTTACAGATTGCTGCTTGT AAGGTAATAAGCATGCTCCC	101	S67818.1
GPX 1	GCAACCAGTTTGGGCATCA CTCGCACTTTTCGAAGAGCATA	116	NM_174076.3

O ciclo de quantificação (CQ) em que a fluorescência aumenta é determinado para cada amostra. Quando a eficiência é próxima de 1, dentro da região da curva de amplificação, a diferença de um ciclo é equivalente ao dobro da amplificação do produto de PCR (Figura 7).

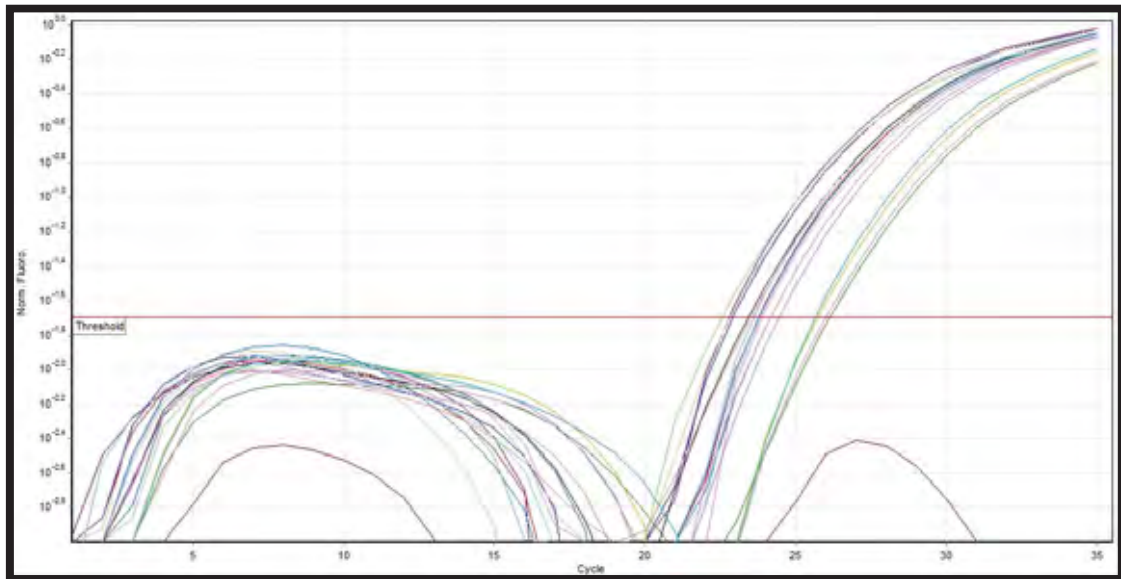


Figura 7: Exemplo de curvas de amplificação por PCR em tempo real e linha de quantificação (definida como o ponto médio da janela de linearidade). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha de quantificação corresponde ao CQ.

Para a quantificação dos níveis de expressão, foi utilizado o método comparativo de CQ (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008a). A quantificação foi normalizada através do gene referência, H2AFZ. O valor de ΔCQ é determinado pela diferença entre o valor do CQ do gene de interesse e o valor de CQ do gene referência (H2AFZ), para cada amostra. O cálculo de $\Delta\Delta\text{CQ}$ foi feito utilizando o valor médio de ΔCQ do grupo controle, como uma constante para subtrair de todos os outros valores médios de ΔCQ de todas as amostras para cada gene estudado. A quantificação da expressão gênica foi calculada através da fórmula

$$2^{-\Delta\Delta\text{CQ}}$$

5.5.4. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). A quantificação da expressão gênica foi analisada usando one-way ANOVA e através da comparação de médias utilizando Teste Holm-Sidack. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Produção *in vitro* de embriões

Para avaliar o efeito do sêmen sexado por gradiente de densidade e por citometria de fluxo na PIVE, foram realizadas 4 repetições para cada tratamento.

Os resultados referentes à PIVE estão representados na Tabela 2, na qual está indicada o número total de oócitos utilizado na PIVE, quantos destes oócitos haviam clivado 48 horas após a fecundação (e sua relação com o número total de oócitos, expressa em porcentagem), quantos embriões se desenvolveram até estágio de blastocisto (e sua relação com o número total de oócitos iniciais, expressa em porcentagem).

Com relação às taxas de clivagem e blastocisto (Tabela 2) não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$), o mesmo ocorreu com as taxas de blastocisto, portanto pode-se afirmar que as metodologias empregadas para a sexagem de espermatozóides não afetam as taxas de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*.

Tabela 2: Controle de qualidade da produção *in vitro* de embriões considerando como parâmetros as taxas de clivagem e de blastocisto.

Grupos	Taxa de Clivagem % média ± DP (n)	Taxa de Blastocisto % média ± DP (n)
Controle	80,69 ± 4,06 (429) ^{ns}	35,05 ± 6,43 (184) ^{ns}
Centrifugação em gradiente de densidade	72,73 ± 8,90 (449) ^{ns}	32,86 ± 4,00 (202) ^{ns}
Citometria de Fluxo	75,85 ± 3,54 (402) ^{ns}	30,73 ± 11,96 (158) ^{ns}
Total de oócitos utilizados		1665

DP: desvio padrão

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).

6.2. Efeito do método de sexagem na expressão gênica de embriões

No presente estudo foram quantificados os níveis de expressão de genes relacionados ao reconhecimento de gestação e desenvolvimento da placenta (AKR1B1, COX2, IGF2R e PLAC8), ao estresse oxidativo (MnSOD e GPX1), ao metabolismo (SCL2A1) e apoptose celular (TP53).

Para realizar a quantificação relativa da expressão de genes candidatos para a qualidade embrionária, utilizou-se o grupo controle como referência, e se calculou a diferença de expressão gênica dos embriões obtidos com espermatozoides sexados por centrifugação em gradiente de densidade e por citometria de fluxo pelo método comparativo de CQ (fórmula $2^{-\Delta\Delta CQ}$). Os valores médios e os desvios padrão de CQ e ΔCQ (normalizado em relação a H2AFZ), para cada gene avaliado, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de CQ e Δ CQ, dos genes candidatos para qualidade embrionária, para os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo.

Gene	Grupo Experimental	CQ \pm DP	Δ CQ \pm DP
AKR1B1	Controle	20,65 \pm 0,8	2,37 \pm 0,35
	Gradiente de densidade	20,69 \pm 0,11	2,23 \pm 0,16
	Citometria de fluxo	20,73 \pm 0,29	3,08 \pm 0,16
COX2	Controle	20,71 \pm 0,27	2,78 \pm 0,08
	Gradiente de densidade	21,53 \pm 0,31	3,19 \pm 0,54
	Citometria de fluxo	23,14 \pm 1,70	4,77 \pm 0,19
IGF2R	Controle	25,32 \pm 0,65	7,48 \pm 0,42
	Gradiente de densidade	25,37 \pm 0,41	7,44 \pm 0,47
	Citometria de fluxo	25,00 \pm 0,33	7,42 \pm 0,20
PLAC8	Controle	23,93 \pm 0,39	5,38 \pm 0,20
	Gradiente de densidade	23,87 \pm 0,70	4,97 \pm 0,17
	Citometria de fluxo	23,68 \pm 0,19	5,76 \pm 0,53
MnSOD	Controle	23,93 \pm 0,45	5,39 \pm 0,18
	Gradiente de densidade	24,75 \pm 1,07	5,26 \pm 0,13
	Citometria de fluxo	23,25 \pm 0,42	5,55 \pm 0,11
GPX1	Controle	20,20 \pm 0,68	1,90 \pm 0,09
	Gradiente de densidade	20,46 \pm 0,72	2,19 \pm 0,29
	Citometria de fluxo	19,60 \pm 0,98	1,86 \pm 0,32
SCL2A1	Controle	23,85 \pm 0,29	5,42 \pm 0,34
	Gradiente de densidade	23,12 \pm 0,04	4,74 \pm 0,18
	Citometria de fluxo	22,87 \pm 0,75	5,06 \pm 0,35
TP53	Controle	22,15 \pm 0,62	3,85 \pm 0,10
	Gradiente de densidade	23,51 \pm 1,33	4,42 \pm 0,10
	Citometria de fluxo	22,31 \pm 0,54	4,61 \pm 0,26

Após a análise dos dados do estudo comparativo de ciclos de quantificação, observou-se redução de 40% nos níveis de transcritos do gene AKR1B1 no grupo citometria de fluxo em relação ao grupo controle ($P=0,023$) e de 50% em relação a centrifugação em gradiente de densidade ($P<0,001$), mostrando que o método de sexagem por citometria de fluxo diminui a expressão deste gene.

Em relação à diferença de expressão do gene COX2, o grupo citometria de fluxo também apresentou 75% de redução no nível de transcritos em relação ao grupo controle ($P=0,016$), e 50% em relação ao gradiente de densidade ($P<0,001$). Apesar do grupo gradiente de densidade apresentar redução de 25% na frequência de transcritos em relação ao grupo controle, não houve diferença estatística ($P=0,178$). A frequência de transcritos do gene IGF2R, não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos experimentais. (Figura 8).

Avaliando a diferença de expressão do gene PLAC8, observou-se que o grupo gradiente de densidade apresentou maior abundância de transcritos em relação aos grupos controle ($P=0,007$) e à citometria de fluxo ($P=0,01$), 34% e 57%, respectivamente (Figura 8).

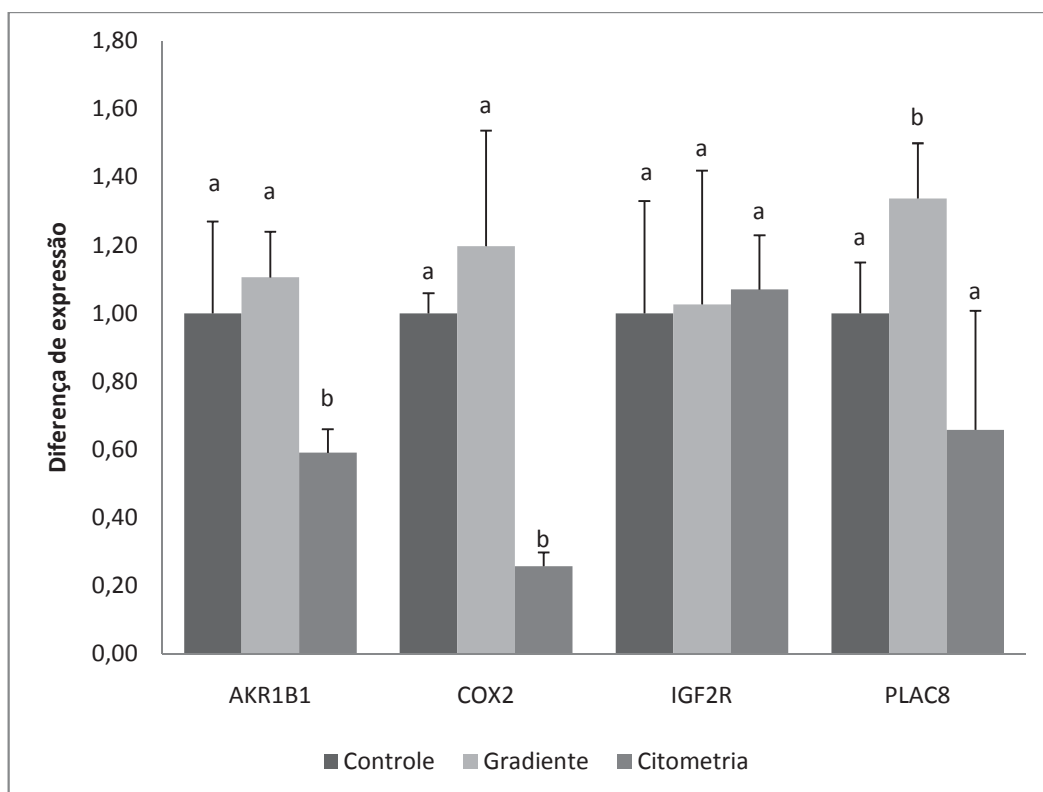


Figura 8. Diferença de expressão, para os genes relacionados ao reconhecimento de gestação e formação da placenta, entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P<0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

Avaliando os genes relacionados a resposta oxidativa, encontrou-se diferenças apenas nos níveis de expressão do gene MnSOD. A frequência de transcritos deste gene no grupo gradiente de densidade é 20% mais elevada em relação ao grupo citometria de fluxo ($P=0,013$), mas não difere do grupo controle ($P=0,296$). Não se

observou diferenças ($P=0,162$) nos níveis de expressão entre os grupos controle e citometria de fluxo (Figura 9).

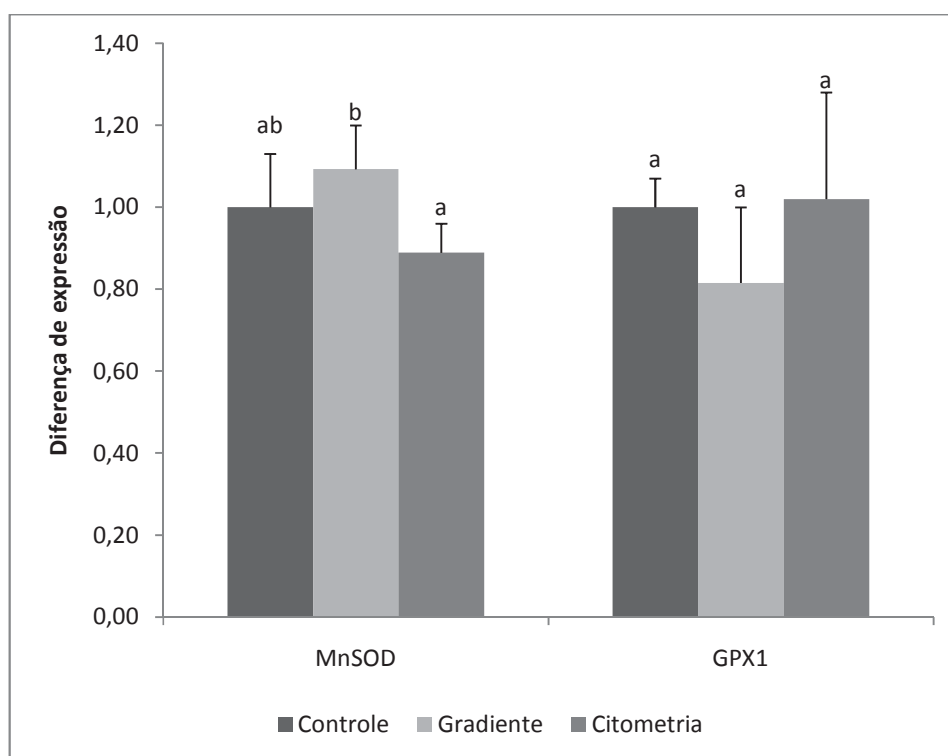


Figura 9. Diferença de expressão, para os genes relacionados à resposta oxidativa entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P<0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

Avaliando o gene associado ao metabolismo celular (SCL2A1), encontrou-se aumento na frequência de transcritos em embriões produzidos com espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade, sendo os níveis 65% mais elevados quando comparamos com o grupo controle ($P=0,028$) e 28% mais elevado que a citometria de fluxo ($P=0,232$). O grupo citometria de fluxo, mesmo apresentando aumento de 37% nos níveis de expressão, não diferiu do grupo controle ($P=0,239$) (Figura 10).

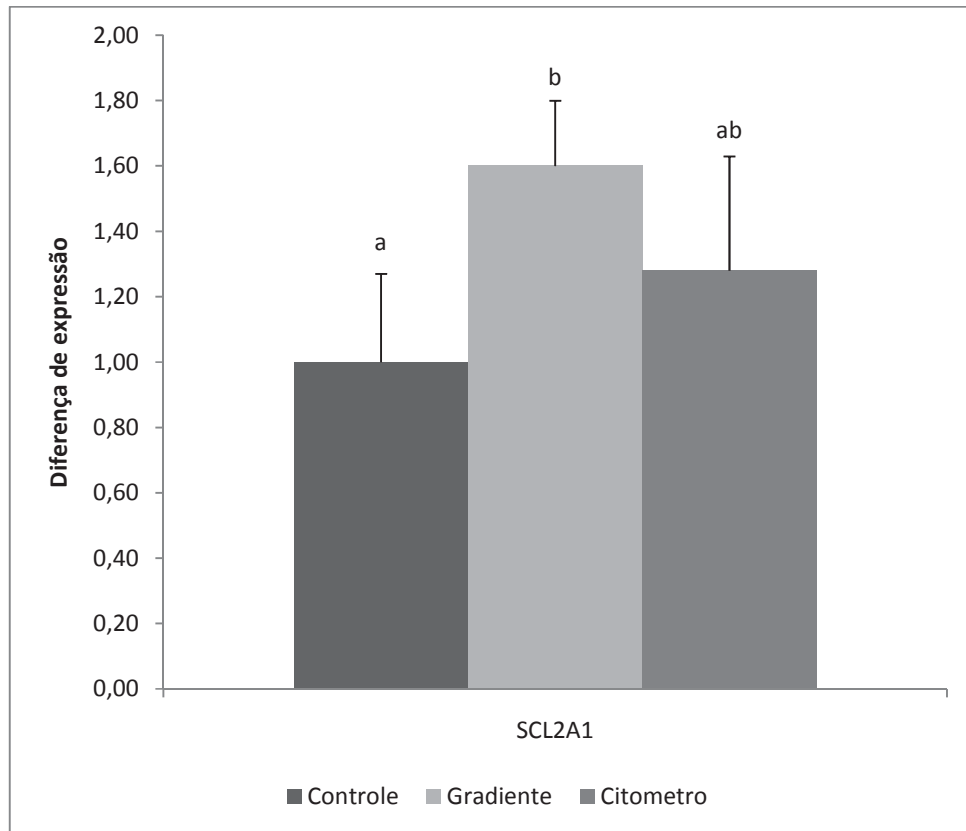


Figura 10. Diferença de expressão, para o gene relacionado ao metabolismo celular entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

Os níveis de expressão do gene TP53, estão 33% e 42% reduzidos nos grupos gradiente de densidade ($P < 0,001$) e citometria de fluxo ($P = 0,02$), respectivamente, em relação ao grupo controle. Os grupos gradiente de densidade e citometria de fluxo, não diferiram ($P = 0,226$) entre si (Figura 11).

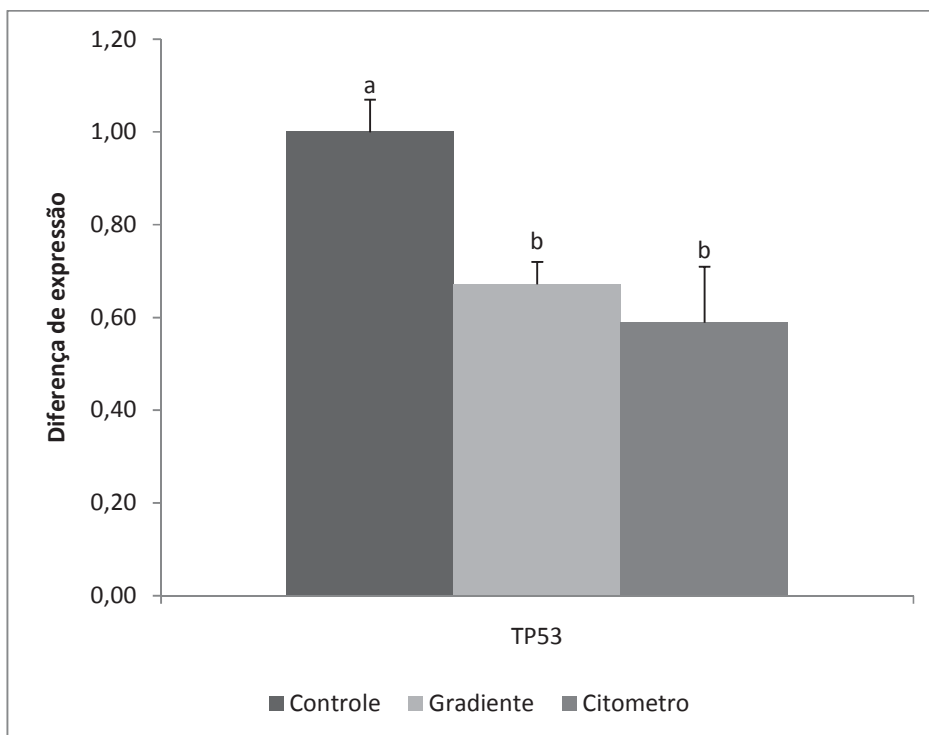


Figura 11. Diferença de expressão, para o gene envolvido em mecanismos de apoptose celular entre os grupos controle, gradiente de densidade e citometria de fluxo. Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$). Grupo referência = controle. Barras desvio padrão.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram utilizados dois métodos de seleção do sexo de espermatozóides, a centrifugação em gradiente de densidade e a citometria de fluxo, para produzir embriões portadores do cromossomo X. Avaliou-se o desenvolvimento embrionário de ambas as técnicas e comparou-se ao grupo controle, utilizando sêmen não sexado. Posteriormente, estes embriões foram utilizados para quantificar a expressão de genes candidatos para a qualidade embrionária, através da quantificação relativa por PCR em tempo real, com o objetivo de verificar se as técnicas de sexagem alteraram o padrão de expressão destes genes.

7.1. Produção *in vitro* de embriões

A seleção de sexo de espermatozóides bovinos é uma ferramenta muito utilizada na indústria PIVE, visando diminuir a proporção de embriões machos produzidos pelo sistema de cultivo *in vitro*, pois os embriões machos se desenvolvem mais rapidamente que as fêmeas (GUTIÉRREZ-ÁDAN et al., 2001; 2004); e como principal objetivo, produzir fêmeas para reposição para a pecuária leiteira.

Neste estudo, utilizou-se as duas técnicas disponíveis para a seleção de espermatozóides portadores do cromossomo X, a citometria de fluxo que tem uma acuidade de separação de 90% (GARNER et al., 1983; BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a), e a centrifugação em gradiente de densidade com acuidade de separação de até 70% (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003). Esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de separar espermatozóides portadores do cromossomo X, sem causar danos aos espermatozóides que possam prejudicar a capacidade de fecundação (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003; 2011a; LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE et al., 2010a; 2010b).

No presente estudo, ficou demonstrado que as técnicas de seleção do sexo de espermatozóides não interferem no desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*,

pois os grupos experimentais não diferiram entre si, tanto para taxas de clivagem como para taxas de blastocisto.

7.1.1. Centrifugação em gradiente de densidade

A sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade resultou em 72% e 32% de taxas de clivagem e de desenvolvimento de blastocisto, respectivamente, corroborando com os dados obtidos por HOSSEPIAN DE LIMA et al., (2003) que, utilizando sexagem de espermatozóides por gradiente descontínuo de densidade, observaram taxas de clivagem de 75% e de desenvolvimento embrionário de 30%, com acuidade de sexagem de até 70%. LUCIO (2007), utilizando o mesmo método de sexagem, também observou taxas de clivagem de 70% e de blastocisto de 27,6%. No entanto, PERINI (2007), observou taxa de clivagem mais baixa, 58%, em relação ao presente estudo, mas a taxa de blastocisto foi de 35%.

RESENDE et al. (2010a), utilizando centrifugação em gradiente contínuo de Percoll, observou taxa de clivagem de 70%, corroborando com os dados obtidos no presente estudo, mas obteve taxa de blastocisto de 23%, mostrando que a centrifugação em gradiente de densidade afeta o desenvolvimento embrionário.

Apesar de não significativo, a centrifugação em gradiente de densidade apresentou taxas de clivagem e blastocistos menores que o grupo controle, 80% e 35%, respectivamente, e taxa de clivagem inferior a citometria de fluxo (75%). O mesmo foi observado em todos os trabalhos em que se utilizou a centrifugação para selecionar espermatozóides portadores do cromossomo X (HOSSEPIAN DE LIMA et al, 2003; LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE et al., 2010a), comprovando que esta metodologia possui repetibilidade para o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

Os espermatozóides utilizados no presente estudo passaram por processo de congelação/descongelação e, após isto, foram submetidos à centrifugação nos gradiente de densidade. Os processos de congelação/descongelação aumentam a proporção de espermatozóides capacitados que sofreram reação acrossomal (BARABAS & MASCARENHAS, 2009), afetam a função mitocondrial (JANUSKAUSKAS

et al., 2005), alteram a estrutura da cromatina espermática (GRAVANCE et al., 1998; THUNDATHIL et al., 1999) e induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que prejudicam a fertilidade (O'FLAHERTY et al., 1997). Além disso, a centrifugação em gradiente de densidade aumenta a proporção de células com membrana acrossomal danificada (LUCIO, 2007; OLIVEIRA, 2009; RESENDE et al., 2010a). Todos estes resultados mostram uma redução na longevidade e um prejuízo na habilidade do espermatozóide em fertilizar o oócito e sustentar um desenvolvimento embrionário (DEFOIN et al., 2008). Devido a estes fatores o uso da centrifugação em gradiente de densidade para separar espermatozóides que serão utilizados na fecundação *in vitro*, tem a probabilidade de diminuir as taxas de clivagem e blastocisto, quando comparados com o grupo controle.

Mas, em estudos anteriores, foi comprovado que a centrifugação de sêmen congelado/descongelado em gradiente de densidade de Percoll, selecionou espermatozóides sem fragmentação no DNA (RESENDE et al., 2010b), com motilidade elevada (70 a 80%), reduziu a proporção de espermatozóides com defeitos maiores e aumentou o percentual de células com membrana plasmática íntegra (OLIVEIRA, 2009), selecionando os espermatozóides que não foram danificados pelo processo de congelação/descongelação.

7.1.2. Citometria de Fluxo

A sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo apresentou 75,85% de clivagem (inferior ao grupo controle e superior ao gradiente de densidade) ($P > 0,05$) e 30,73% ($P > 0,05$) de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto, taxa inferior quando comparada aos grupos controle e gradiente de densidade. UDERWOOD et al. (2010), avaliando os efeitos da citometria de fluxo no desenvolvimento embrionário, encontrou 78,8% e 35,9% de taxas de clivagem e blastocisto, respectivamente, confirmando os dados obtidos neste estudo. Outros experimentos também relataram taxas médias de clivagem de 70% e de blastocisto de 30% (ZHANG et al., 2003; LU et al., 2004; XU et al., 2006), demonstrando que a

citometria de fluxo não afeta o desenvolvimento embrionário, mas que os efeitos deletérios desta metodologia podem aparecer em estágios mais tardios, como por exemplo durante a implantação do embrião (CARVALHO et al., 2010).

Mas existem resultados controversos na literatura. BERMEJO-ALVAREZ et al. (2010), avaliando o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria, observaram redução nas taxas de clivagem e blastocisto (D7), 67,16% e 15,43%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle. Este experimento, apenas confirmou outros estudos desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa, onde observaram que o uso de sêmen sexado por citometria de fluxo afeta o desenvolvimento embrionário, com taxas médias de clivagem e blastocisto, 60% e 15% respectivamente, quando comparados com o sêmen não sexado (85% de clivados e 40% de blastocistos) (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008a; 2008b). Muitas vezes esses resultados são atribuídos aos efeitos deletérios que este processo de separação causa ao espermatozóide, como a capacitação e redução da longevidade espermática (MAXWELL, et al., 2004).

Estes autores também demonstraram que os oócitos fecundados com sêmen sexado demoravam mais para apresentarem as primeiras divisões celulares quando comparados com embriões produzidos com sêmen convencional (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a). Este atraso na clivagem pode estar associado a danos causados pela citometria de fluxo como a redução da motilidade espermática (HOLLINSHEAD et al., 2003) e as baixas porcentagens de células com membrana e acrossoma intactos (CARVALHO et al. (2010), refletindo a diminuição de potencial para o desenvolvimento embrionário.

Os riscos associados com o processo de sexagem por citometria de fluxo como a utilização do Hoeschst 33342, a utilização do laser, exposição dos espermatozóides a cargas elétricas têm sido relatados como causa de danos no DNA dos espermatozóides (LIBBUS et al., 1987). Danos no DNA de espermatozóides têm sido associados às baixas taxas de fecundação (AITKEN et al., 2004), prejuízos no desenvolvimento pré-implantacional do embrião (FATEHI et al., 2006), alterações no padrão de genes

importantes para o desenvolvimento embrionário (MORTON et al., 2007) e no aumento das taxas de aborto (BAKER e AITKEN, 2005).

UNDERWOOD et al. (2010b) com o objetivo de verificar a fertilidade do sêmen sexado por citometria de fluxo, desenvolveu um experimento em que inseminou novilhas com sêmen não sexado e com sêmen sexado, e observou as taxas de prenhez e a perda de gestação. O grupo controle apresentou 49,63% de novilhas prenhas, e após 63 dias da inseminação observaram perda de 2% da gestação. Já com o sêmen sexado, observou taxa de gestação média de 2,2% e perda de 100% de prenhez. Estes autores atribuíram as baixas taxas de prenhez e as perdas embrionárias a fatores ambientais e também e as injúrias que a citometria de fluxo causa ao espermatozóide.

7.2. Expressão gênica de embriões

A avaliação da viabilidade embrionária é crucial para o estabelecimento e manutenção da gestação (WRENZYCKI, et al., 2007). O estudo da qualidade do embrião pode ser feita através da morfologia (VAN SOOM et al., 2003) ou através da quantificação de genes importantes para o desenvolvimento pré-implantacional, estabelecimento e manutenção da gestação (WRENZYCKI, et al., 2007).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam diferenças nos padrões morfológicos, no tempo de desenvolvimento e no metabolismo, quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (LONERGAN et al., 2003; RIZOS et al., 2008). Modificações no padrão de desenvolvimento e crescimento fetal são observadas em embriões produzidos *in vitro* e podem estar associados a alterações nos padrões de expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (WRENZYCKI, et al., 2005). Pode-se relatar alguns fatores que afetam a frequência de transcritos nos embriões: o cultivo *in vitro* pós-fecundação, que aumenta a incidência de anormalidades cromossômicas (LONERGAN et al., 2004), algumas biotecnologias reprodutivas como a transferência nuclear (WRENZYCKI, et al., 2002) e a seleção do sexo de espermatozóides por citometria de fluxo (MORTON et al., 2007).

Para investigar o efeito da sexagem de espermatozóides na qualidade do embrião, analisou-se a abundância de mRNA de 8 genes candidatos em blastocistos produzidos com sêmen não sexado, sexado por gradiente de densidade e por citometria de fluxo. Esses genes foram selecionados cuidadosamente, pois seus níveis de expressão não diferem entre os sexos (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010b).

7.2.1. Genes envolvidos nos processos de reconhecimento de gestação e formação da placenta (AKR1B1, COX2, IGF2R, PLAC8)

Muitos trabalhos existentes na literatura utilizaram os genes AKR1B1, COX2, IGF2R e PLAC8 como candidatos para qualidade embrionária, pois estão envolvidos nos processos de implantação, formação da placenta e reconhecimento da gestação (EL-SAYED et al., 2006; GOMEZ et al., 2009a; 2009b; BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a; 2010c; SAINT-DIZIER et al., 2011).

A aldose redutase 1 pertence a superfamília aldo-keto redutase (AKR), a qual é responsável pela oxidoredução de uma variedade de substratos endógenos e exógenos, incluindo aldoses, monossacarídeos e prostaglandinas (HYNDMAN et al., 2003). As PGs são reconhecidas como mediadores essenciais das funções reprodutivas nas fêmeas, e são produzidas pela conversão do AA por ciclooxigenases (COX), em a PGH_2 , a qual é sintetizada em PGE_2 pela ação da PGE sintase (BAYNE et al., 2009), ou em $PGF2\alpha$ pela ação de PGF sintase. A PGE_2 é responsável pela maturação do oócito em humanos (BAYNE et al., 2009), desenvolvimento e implantação do embrião, e reconhecimento da gestação em bovinos (SAINT-DIZIER et al., 2011). A $PGF2\alpha$ está envolvida nos processos de regressão do corpo lúteo e em falhas na implantação e término da gestação.

No presente trabalho, comparando os níveis de expressão do gene AKR1B1 entre os grupos controle e sexagem por citometria de fluxo, observou-se redução significativa na abundância de transcritos e, também, em relação à centrifugação em gradiente de densidade. Os embriões produzidos com sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade apresentam acréscimo nos níveis de mRNA de AKR1B1.

Ambas as metodologias de seleção do sexo de espermatozoides afetam a expressão deste gene. Alguns trabalhos mostram que níveis elevados de AKR1B1 em blastocistos bovinos causam morte embrionária (EL-SAYED et al., 2006) e outros mostram que níveis elevados mRNA deste gene são favoráveis ao desenvolvimento de embriões viáveis (REKIK et al., 2011).

A enzima AKR1B1 exerce duas atividades, o metabolismo da progesterona, a qual é muito importante para a implantação do embrião, e a síntese de PGF2 α , responsável pela regressão do corpo lúteo e subsequente término da gestação. AKR1B1 tem sido detectada em embriões bovinos produzidos *in vitro* (DODE et al., 2006; EL-SAYED et al., 2006) e sua expressão tem sido associada com embriões que falham em estabelecer gestação ou que levam a reabsorção fetal (EL-SAYED et al., 2006).

Avaliando a expressão do gene COX2, no presente trabalho, observaram-se níveis reduzidos de transcritos em embriões produzidos com sêmen sexado pelo gradiente de densidade (P=0,178) e pela citometria de fluxo (P=0,016), em relação ao grupo controle. Os embriões produzidos com sêmen sexado por citometria apresentam uma redução de 75% em seus níveis de mRNA, sugerindo que esta metodologia afeta o padrão de expressão deste gene. Já a centrifugação em gradiente de densidade apresentou redução de 25% na abundância de transcritos em relação ao grupo controle, sugerindo que este método de seleção do sexo de espermatozoides causa menos impacto ao embrião do que a sexagem em citômetro de fluxo.

Em blastocistos e blastocistos expandidos os níveis de COX2 são extremamente elevados, sugerindo que a biossíntese de PGE₂, também está envolvida no processo de eclosão (SAINT-DIZIER et al., 2011). Em ovinos, CHARPIGNY et al. (1997), encontraram níveis elevados de transcritos da enzima COX2 em células do trofoblasto, mas não encontraram a proteína deste gene nas células da massa celular interna (ICM), sugerindo que estes transcritos são necessários para o processo de alongação, resultando em uma intensa proliferação das células do trofoblasto e subsequente implantação.

SAINT-DIZIER et al. (2011) associaram a qualidade embrionária aos níveis de expressão de COX2. Blastocistos expandidos grau 1 (avaliados morfológicamente) apresentavam níveis elevados de mRNA de COX2, já os blastocistos com qualidade inferior apresentavam níveis reduzidos de transcritos, sugerindo que embriões produzidos *in vitro* de alta qualidade possuem maior competência embrionária e também grande capacidade de sintetizar PGE₂.

De acordo com os resultados obtidos em relação aos níveis de expressão do gene PLAC8, os blastocistos produzidos com sêmen sexado por gradiente de densidade apresentam 57% mais transcritos que os blastocistos produzidos com sêmen sexado por citometria de fluxo. A função deste gene ainda não está elucidada completamente, mas existe relatos que níveis elevados deste gene estão relacionados com viabilidade embrionária (REKIK et al., 2011) e sucesso na gestação (EL-SAYED et al., 2006).

O gene PLAC8 parece estar expresso em células de fibroblastos (MANSOURI-ATTIA et al., 2009), em células do trofoblasto na fase pré-implantacional, bem como em células gigantes do trofoblasto (GALAVIZ-HERNANDEZ et al., 2003). Em bovinos, existem relatos de este gene apresentar níveis elevados de transcritos em biópsias de blastocistos que geraram uma cria do que naqueles que sofreram perda gestacional, e também em células do endométrio de fêmeas gestantes comparadas com não gestantes (KHURANA & NIEMANN, 2000; GALAVIZ-HERNANDEZ et al., 2003; EL-SAYED et al., 2006).

Em mamíferos, o sistema IGF desempenha um papel fundamental regulando o crescimento e o desenvolvimento fetal (ALLAN et al., 2001). IGF2 e IGF2R são genes “imprinted” que desempenham um papel importante no desenvolvimento pré-implantacional. No entanto, o IGF2R é responsável por reduzir a disponibilidade de IGF2 biologicamente ativo (FARIN et al., 2010). O IGF2R é classificado como um inibidor de crescimento, e a ausência de seus transcritos pode acarretar o crescimento exagerado do feto (FOUSLTONE et al 2005), ou seja, pode causar a síndrome da cria gigante em bovinos e ovinos (YOUNG et al., 2001).

O gene IGF2R, responsável pelo controle do crescimento fetal, no presente trabalho não apresentou diferenças nos níveis de transcritos em blastocistos produzidos *in vitro* derivados dos três tratamentos estudados. Sugerindo que os métodos de sexagem não afetam um gene relacionado ao crescimento e desenvolvimento do feto.

BERMEJO-ALVAREZ et al. (2010a) avaliando os efeitos da seleção do sexo de espermatozóides de *Bos taurus* por citometria de fluxo em embriões fêmeas, utilizou os genes AKR1B1, COX2, IGF2R e PLAC8, como candidatos para qualidade embrionária, não encontraram diferenças nos níveis de expressão quando comparados com o grupo controle. Estes resultados não corroboraram com o presente trabalho, pois se encontrou diferenças nos níveis de transcritos dos genes AKR1B1, COX2 e PLAC8, sugerindo que a citometria de fluxo interfere no padrão de expressão destes genes, podendo resultar em embriões de baixa qualidade, prejudicando a implantação e reconhecimento da gestação.

EL-SAYED et al. (2006), estudou o perfil de expressão gênica de biópsias de blastocistos bovinos em associação com o nascimento, para identificar genes candidatos relacionados a competência embrionária. Após a biópsia, esses embriões foram transferidos, e as receptoras foram monitoradas para verificar quais retornaram ao cio e quais estavam prenhas. As biópsias que resultaram em nascimento apresentaram níveis elevados de transcritos dos genes COX2 e PLAC8, e as biópsias que resultaram em perda gestacional apresentaram níveis elevados de AKR1B1.

REKIK et al. (2011), com o objetivo de encontrar genes candidatos para a qualidade de embriões bovinos utilizaram a análise global de transcriptoma para avaliar a expressão de genes em blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos. Após a análise dos chips de expressão, alguns genes com níveis elevados de expressão foram selecionados e validados por PCR em tempo real, dentre eles estavam genes como IFN τ , PLAC8, SSLP1 (resposta imunológica e estabelecimento da gestação), AKR1B1 (metabolismo de carboidratos). Segundo esses autores, esses genes, podem ser considerados como candidatos para a qualidade embrionária.

7.2.2. Genes relacionados a resposta oxidativa (MnSOD e GPX1)

O estresse oxidativo é o fator principal que afeta o desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 2003). MnSOD é uma enzima que está localizada na matriz mitocondrial, e está envolvida na primeira via enzimática que protege as células contra radicais livres, removendo o ânion superóxido e transformando em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é eliminado pelo GPX1 (GUERIN et al., 2001), esta enzima GPX, também é responsável por reduzir hidroperóxidos de lipídeos (LIMAYE et al., 2003), sugerindo que GPX1 desempenha um papel muito importante como protetor antioxidante da célula (GUERIN et al., 2001).

Os níveis de transcritos do gene MnSOD observados no presente trabalho são significativamente mais elevados nos blastocistos produzidos *in vitro* com sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade do que naqueles produzidos com sêmen sexado por citometria de fluxo. Os níveis de mRNA do gene GPX1 não diferiram entre os tratamentos estudados.

A elevada expressão de MnSOD é uma resposta positiva do embrião ao estresse oxidativo que está submetido *in vitro*, muitas vezes pelas condições dos meios de cultivo, temperatura, luz e tensão de oxigênio (MUNDIN et al., 2009). Em nosso sistema de PIV, os embriões foram submetidos ao cultivo *in vitro* com atmosfera controlada de 5% de CO_2 , 5% O_2 e 90% de N_2 , visando diminuir a proporção de machos (GUTIÉRREZ-ÁDAN, et al., 2001) e reduzir o estresse oxidativo sofrido pelas células (CORRÊA et al., 2008). O aumento das espécies reativas de oxigênio pode alterar importantes funções celulares incluindo a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário (MOUATASSIN et al., 1999).

CORRÊA e colaboradores (2008) avaliando as condições de cultivo *in vitro* de embriões, compararam os níveis de expressão de MnSOD e GPX em embriões cultivados em atmosfera com 20% de O_2 e 5% de O_2 . Esses autores observaram melhores níveis de expressão do gene MnSOD em atmosfera com baixa concentração de O_2 . A abundância de transcritos do gene GPX não diferiu entre os tratamentos, mas

estes autores sugeriram que este gene tem uma tendência em apresentar níveis elevados de expressão em baixa tensão de O₂.

Não existem trabalhos na literatura que demonstram diferenças em relação aos níveis de transcritos do gene MnSOD entre embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria de fluxo e não sexado. Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se sugerir que a citometria de fluxo prejudica o mecanismo de resposta do embrião ao estresse oxidativo sofrido pelas células embrionárias pelo sistema de cultivo *in vitro*. No entanto, a centrifugação em gradiente de densidade é eficiente em selecionar espermatozóides sem danos que são capazes de produzir blastocistos que apresentem níveis elevados de mRNA do gene MnSOD, ou seja, produzem maior quantidade de enzima capaz de metabolizar as espécies reativas de oxigênio podendo ser considerado um embrião de melhor qualidade. A maior abundância de transcritos de MnSOD mas não de GPX1, estão relacionadas com a redução de células apoptóticas bem como sendo relacionadas a embriões de elevada qualidade (RIZOS et al., 2003; 2004).

7.2.3. SCL2A1 (metabolismo celular)

Na literatura, existem muitos trabalhos que utilizam a abundância relativa do gene SCL2A1 como candidato para verificar se as condições adversas do cultivo *in vitro* de embriões (temperatura, tensão de oxigênio, presença de soro fetal) afetam a competência de blastocistos bovinos. A expressão de SCL2A1 é frequentemente mensurada comparando diferentes sistemas de cultivo (de OLIVEIRA et al., 2005). O gene SCL2A1 é responsável por incorporar glicose no interior das células embrionárias através do período de desenvolvimento pré-implantacional (LEQUARRE et al., 2003; de OLIVEIRA et al., 2005) e está expresso tanto nas células do trofoblasto como na massa celular interna (ICM) em embriões de ratos, transportando glicose do trofoblasto para a ICM. Em bovinos SCL2A1 é expresso em todos os estágios embrionários, desde embriões de duas células até blastocisto (AUGUSTIN et al., 2001). Em blastocistos

expandidos está predominantemente expresso na trofoblasto (WRENZYCKI et al., 2003).

A abundância de mRNA do gene SCL2A1 no presente trabalho foi significativamente mais elevada nos embriões produzidos com sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade quando comparada com o grupo controle. Os níveis de transcritos deste gene nos blastocistos produzidos com sêmen sexado por citometria de fluxo não diferiram em relação aos tratamentos, apresentando níveis intermediários de expressão. Os níveis elevados de transcritos do gene SCL2A1 sugerem elevadas taxas de respiração e elevada atividade metabólica, sugerindo um importante papel desempenhado por este transportador de glicose no metabolismo de embriões bovinos em estágio pré-implantacional (LOPES et al., 2007).

LOPES et al. (2007), avaliando as taxas de respiração de blastocistos produzidos *in vitro*, a abundância de mRNA do gene SCL2A1 e a morfologia embrionária, demonstraram que existe correlação entre as variáveis citadas, sugerindo que embriões que apresentavam elevados níveis de transcritos de SCL2A1 e altas taxas de respiração apresentavam melhor qualidade.

WRENZYCKI et al. (2001) relataram níveis reduzidos de transcritos do gene SCL2A1 em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com os produzidos *in vivo*, sugerindo que a redução na abundância de mRNA de SCL2A1 foi um indicativo de embriões com desenvolvimento comprometido, ou seja embriões de baixa qualidade. HARVEY et al. (2004), também compararam os níveis de transcritos de genes relacionados ao metabolismo celular, dentre eles o gene SCL2A1, com embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, observaram que os embriões produzidos *in vivo* apresentam maior abundância de mRNA deste gene do que os embriões produzidos *in vitro*, sendo os embriões produzidos *in vivo* considerados de qualidade superior.

Baseado nesses resultados é plausível especular que os blastocistos produzidos *in vitro* com sêmen sexado por gradiente de densidade são de melhor qualidade que os embriões produzidos com sêmen sexado por citometria de fluxo e não sexado. A centrifugação em gradiente de densidade é eficiente em selecionar espermatozóides sem danos no DNA (OLIVEIRA, 2009), permitindo a produção de embriões de melhor

qualidade. O metabolismo da glicose em embriões bovinos é maior entre o período de 8 a 16 células, no qual ocorre a ativação do genoma embrionário (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000). Se houver danos no DNA dos espermatozoides, a ativação do genoma embrionário pode ser prejudicada, causando comprometimento no desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto, podendo prejudicar a implantação.

Com base nessas afirmações, podemos sugerir que a centrifugação em gradiente de densidade é eficiente em selecionar espermatozoides sem alterações no DNA, resultando na produção de blastocistos de melhor qualidade que podem ser transferidos e gerar uma cria viável.

7.2.4. TP53 (apoptose celular)

O gene TP53 é amplamente reconhecido como gene supressor tumoral e codifica a proteína p53. Esta proteína está envolvida na regulação do ciclo celular e apoptose, desenvolvimento, diferenciação, amplificação gênica, recombinação do DNA, segregação cromossômica e senescência celular (revisado por HOFSETH et al., 2004). A proteína p53 é um fator transcripcional e tem como papel fundamental a habilidade para ativar a expressão de genes envolvidos no reparo de danos no DNA e apoptose celular (WELLS et al., 2005). TP53 é ativada em resposta a uma variedade de estresse celular, incluindo danos no DNA, aberrações no fuso mitótico, estresse calórico, crescimento celular desregulado, entre outros (VOGELSTEIN et al., 2000; HOFSETH et al., 2004).

A seleção do sexo de espermatozoides altera a expressão do gene TP53 em blastocistos produzidos *in vitro*. Ambas as metodologias utilizadas no presente trabalho reduziram os níveis de transcritos deste gene quando comparados aos embriões produzidos com sêmen não sexado. BERMEJO-ALVAREZ (et al., 2010a) avaliando o efeito da sexagem por citometria de fluxo, através da quantificação da abundância de mRNA do gene TP53, em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, não encontraram diferenças nos níveis de expressão.

WELLS et al. (2005) caracterizaram a expressão de genes em embriões humanos e associaram a morfologia embrionária anormal com alterações na atividade gênica. Dentre os genes estudados, o TP53 apresentou níveis elevados de transcritos sendo altamente correlacionados com a fragmentação celular. Com base nesse resultado, estes autores relataram que a elevada expressão de TP53 sugere que os blastômeros fragmentados sofreram algum tipo de estresse e que as vias de reparo de DNA e apoptose estavam sob controle da proteína p53. Também inferiram que danos no DNA aumentam a atividade de TP53 em blastômeros fragmentados.

A citometria de fluxo causa danos no DNA de espermatozoides (CARVALHO et al., 2010), e esses danos estão correlacionados com falhas na gestação (VIRRO et al., 2004), alterações nos padrões de mRNA e efeitos nas crias a longo prazo (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2008). Se os danos no DNA de espermatozoides não forem reparados pelo oócito, pode causar um perfil pró-apoptótico nos blastocistos resultantes (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a).

Com base nessas afirmações, pode-se sugerir que as técnicas de seleção do sexo de espermatozoides alteram o padrão de expressão do gene TP53, reduzindo os níveis da proteína p53, ocasionando falhas na ativação dos genes de reparo do DNA das células prejudicando o desenvolvimento dos embriões. Também pode-se sugerir que os baixos níveis desta proteína, pode estar relacionado com redução da apoptose celular, gerando embriões de melhor qualidade. Para suportar uma dessas afirmações, mais estudos devem ser realizados, como por exemplo, estudar o perfil de expressão de genes envolvidos no processo de reparo do DNA e estudar genes pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos.

8. CONCLUSÃO

De acordo os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1) Os métodos de seleção do sexo de espermatozóides por gradiente de densidade e por citometria de fluxo não alteram o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*.

2) Quanto aos padrões de expressão gênica em embriões produzidos *in vitro*:

a) o método de citometria de fluxo reduz os níveis de expressão do gene AKR1B1, resultando em embriões de baixa qualidade.

b) o método de citometria de fluxo reduz os níveis de expressão do gene COX2, resultando em embriões que tem baixa capacidade de alongação e implantação;

c) a centrifugação em gradiente de densidade aumenta os níveis de expressão do gene PLAC8, favorecendo a implantação do embrião.

d) a centrifugação em gradiente de densidade aumenta os níveis de expressão do gene MnSOD, promovendo uma resposta positiva ao desenvolvimento de embriões viáveis;

e) a centrifugação em gradiente de densidade aumenta os níveis de expressão do gene GLUT1, resultando em embriões de melhor qualidade;

f) ambas as técnicas reduzem os níveis de expressão do gene TP53.

A técnica de sexagem por citometria de fluxo altera a expressão de genes envolvidos no processo de implantação, prejudicando o nascimento de uma cria viável. A sexagem produz embriões que não possuem alterações prejudiciais em genes envolvidos no reconhecimento da gestação e formação da placenta, os quais são muito importantes para o processo de implantação; aumenta o padrão de expressão dos genes envolvidos no processo de resposta da célula ao estresse oxidativo e no metabolismo celular, resultando em embriões de melhor qualidade e que são capazes de implantar e possivelmente gerar uma cria viável. Podemos concluir que a centrifugação em gradiente de densidade pode ser considerada uma alternativa à citometria de fluxo por causar menos danos aos embriões produzidos *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL RAZEKIM; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 346 (abstract), 2000.

ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A. A.; DAVOODI, D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. **Human Reproduction**, v. 25, p. 977–985, 2010.

AITKEN, R. J. KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.

ALEAHMAD, F.; GOURABI, H.; ZEINALI, B. et al. Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa by sperm isolation medium gradients evaluated by FISH. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, p.475-8, 2009.

ALLAN, G. J.; FLINT, D. J.; PATEL, K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. **Reproduction**, v. 122, p. 31–39, 2001.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestic Animals**, n. 41, p. 95-97, 2006.

AROSH, J. A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 161–169, 2002.

ASBIA- Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório Anual, 2009.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 370–376, 2001.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.; PUGLISE, R. Gene expression in the in vitro produced pre-implantation bovine embryos. **Zygote**, v.15, p. 355-367, 2007.

BARABAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49-62, 2009.

BARROSO, G., VALDESPIN, C., VEGA, E., KERSHENOVICH, R., AVILA, R., AVENDAÑO, C., OEHNINGER, S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 835-848, 2009.

BARROSO, G.; TAYLOR, S.; MORSHEDI, M.; MANZUR, F. GAVIÑO, F.; OEHNINGER, S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidyserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm sub-population. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 149-154, 2006.

BARTOV, B.; BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; KOGOSOVSKY, A.; YAGODA, A.; LEDERMAN, H. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 1413-1419, 2003.

BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M. S.; ALEEM, A. A.; SHARMA, R. K.; WORLEY, S. E.; THORNTON, J.; AGARWAL, A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 593–600, 2004.

BEKMAN, H.; MEUWISSEN, T.H.E.; OLDENBROEK, J.K. Increasing beef production from dairy cows by implanting embryos from MOET nucleus breeding schemes for beef cattle. **Livestock Production Science**, v.37, p. 271-282, 1994.

BEREMEJO-ÁLVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RATH, D.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A.; RIZOS, D. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 426-436, 2010.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE DIOS HOURCADE, J.; DE FONSECA, F.R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 761–772, 2008.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **PNAS**, v.7, p. 3394-3399, 2010b.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55,171-191, 2001.

BEYHAN Z.; JOHNSON, L.A.; FIRST N.L. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. **Theriogenology**, v.52, p.1115-1116,1999.

BLONDIN, P., M. BEAULIEU, V. FOURNIER, N. MORIN, L. CRAWFORD, P. MADAN AND W.A. KING. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology** 71: 30–38.

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. 1647-1655, 2005.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1050–1055, 1999.

BORCHERSEN, S., PEACOCK, M. Danish AI field data with sexed semen. **Theriogenology**, v. 71, p. 59-63, 2009.

BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e produção *in vitro***. 2008, 94f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

BOUER, M. K.; HARDING, J. E.; BASSETT, N. S.; BREIER, B. H.; OLIVER, M. H.; GALLAHER, B. H.; EVANS, P. C.; WOODALL, S. M.; GLUCKMAN, P. D. Fetal growth and placental function. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 140, p. 115–120, 1998.

BRACKETT, B.G.;BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONANWICK, W.J.; EVANS, J.S.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BRESSON, E.; BOUCHER-KOVALIK, S.; CHAPDELAINE, P.; MADORE, E.; HARVEY, N.; LABERGE, P. Y.; LEBOEUF, M.; FORTIER, M. A. The human aldose reductase *akr1b1* qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the Endometrium. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 210–219, 2011.

BRIGELIUS-FLOHE, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxi-dases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 951-965, 1999.

CANAL CRV LAGOA, v.10, n.29, p.13., 2009. **Sêmen sexado: 500 mil doses**.

CARVALHO, J.O.; SARTORI,R.; MACHADO, GM.; MOURÃO,G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, p.1521-1530,2010.

CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNE´S, 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.

CHANDLER, J. E.; WILSON, M. P.; CANAL, A. M.; STEINHOLT-CHENEVENT, H. C. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1021-1034, 1999.

CHAPDELAINE, P.; KANG, J.; BOUCHER-KOVALIK, S.; CARON, N.; TREMBLAY, J. P.; FORTIER, M. A. Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, p. 309–319, 2006.

CHARPIGNY, G.; REINAUD, P.; TAMBY J. P.; CREMINON, C.; GUILLOMOT, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1032–1040, 1997.

CORREA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIMA, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132–142, 2008.

CRAN, D. G.; JOHNSON, L. A.; MILLER, N. G.; COCHRANE, D.; POLGE, C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. **The Veterinary Record**, v. 132, p. 40–41, 1993.

CRAWFORD, K.; KAUFMAN, P. L. Pilocarpine antagonizes prostaglandin F2 alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F2 alpha. **Archives of Ophthalmology**, v. 105, p. 1112–1116, 1987.

CREYGHTON, M.P.; MARKOULAKI, S.; LEVINE, S.S.; HANNA, H.; LODATO, M.A.; SHA, K.; YOUNG, R.A.; JAENISCH, R.; BOYER, L.A. H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. **Cell**, v. 135, p. 649–661, 2008.

CROSIER, A.E.; FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Development of skeletal muscle and expression of candidate genes in bovine fetuses from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 401–408, 2002.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375–1385, 2002.

CROSS, J.; WERB, Z.; FISHER, S. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, p. 1508–1518, 1994.

CUMMINS, J.M. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 55, p. 1381–1399, 2001.

CURRY, E.; PRATT, S.L.; LAPIN, D.R.; GIBBONS, J.R. Efficacy of a commercially available post-thaw bovine semen sexing kit in both single-ovulating and hyperstimulated cows. **Animal Reproduction Science**, in press, 2009.

- DE JONGE, C.J.; FLAHERTY, S.P.; BARNES, A.M.; SWANN, N.J.; MATTHEWS, C.D. Failure of mutitube sperm swim-up for sex preselection. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 6, p. 1109-1014, 1997.
- DE OLIVEIRA, A. T. D.; LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1559-1572, 2005.
- DE VRIES, A., M. OVERTON, J. FETROW, K. LESLIE, S. EICKER AND G. ROGERS. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 91, p. 847–56, 2008.
- DEFOIN, L.; GRANADOS, A.; DONNAY, I. Analysing motility parameters on fresh Bull semen could help to predicty resistance to freezing: a preliminary study. **Reproduction Domestic Animals**, v. 43, p. 606-611, 2008.
- DEMATAWEWA, C.M.B.; BERGER, P.J. Break-even cost of cloning in genetic improvement of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.4, p.1136-1147, 1998.
- DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, 288–297, 2006.
- DUBY, R.T.; HILL, J.L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E.W.; BOLAND, M.P. Changes induced in the bovine zona pellucid by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, v. 47, p. 332 (abstract), 1997.
- EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; MOTLIK, J.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes in vitro using butyrolactone I: effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 375–386, 2002.
- FARIN, C. E.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, P. W. Expression of messenger RNAs for insulin-like growth factors and their receptors in bovine fetuses at early gestation from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Theriogenology**, v. 74, p. 1288–1295, 2010.
- FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro produced and cloned embryos. **Journal of Animal Science**, suppl E, v.82, E53-E62, 2004.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLADNA, B. M. Damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 176-188, 2006.

FAVETTA, L. A.; ROBERT, C.; JOHN, E. J. St.; BETTS, D. H.; KING, W. A. p66shc, but not p53, is involved in early arrest of in vitro produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 383-392, 2004.

FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; PÉREZ-CRESPO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.; RAMIREZ, M. A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE DIOS HOURCADE, J.; DE FONSECA, F.R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with dna-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 761–772, 2008.

FRENKEL, J.; SHERMAN, D.; FEIN, A.; SCWARTZ, D.; ALMOG, N.; KAPON, A.; GOLDNGER, N.; ROTTER, V. Accentuated apoptosis in normally developing p53 knockout mouse embryos following genotoxic stress. **Oncogene**, v. 18, p. 2901- 2907, 1999.

GALAVIZ-HERNANDEZ, C.; GUSTAAF DE RIDDER, C. F.; TANAKA, T. S.; KO, M. S. H.; SCHLESSINGER, D.; NAGARAJA, R. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p. 81–89, 2003.

GARDNER, D. K.; SHEEHAN, C. B.; RIENZI, L.; KATZ-JAFFE, M.; LARMAN, M. G. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology**, v. 67, p. 64-72, 2007.

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.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA; JOHNSON, L.A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 312-321, 1983.

GHOSH, P.; DAHMS, N. M.; KORNFELD, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. **Nature Reviews. Molecular and Cell Biology**, v. 4, p. 202–212, 2003.

GICQUEL, C.; LE BOUC, Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Hormone Research*, v. 65 (Suppl 3), p. 28 –33, 2006.

GINGER, E.; EXLEY, T.; MCEININNY, A. S.; WARNER C. M. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 231–239, 1999.

GRAVANCE, C.G., VISHWANATH, R., PITT, C., GARNER, D.L., CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 704–709, 1998.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, EL.Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 175–189, 2001.

GUTHRIE, H.D.; JONSHON, L.A.; GARRET, W.M.; WELCH, G.R.; DOBRINSKY, J.R. Flow cytometric sperm sorting: Effects of varying laser power on embryo development in swine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n.1, p.87–92, 2002.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2001.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2004.

HABERMANN, F.A.; WINTER, A.; OLASKER, I.; REICHERT, P.; FRIES, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos Taurus*) by dual colour fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Animal Breeding and Genetic**, v. 122, suppl.1, p. 22-27, 2005.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryos. **Reproduction Reviews**, v. 4, p. 125-134, 1999.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 919-925, 1996.

HARVEY, A. J.; KIND, K. L.; THOMPSON, J. G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction**, v. 123, p. 479–86, 2002.

HOFSETH, L.J.; HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C.C. p53: 25 years after its discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 177-181, 2004.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1421-1433, 1999.

HOLLINSHEAD, F. K., GILLAN, L., O'BRIEN, J. K., EVANS, G., AND MAXWELL, W. M. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 351–359, 2003.

HOSSEIN-ZADEH, N.G.; NEJATI-JAVAREMI, A.; MIRAEI-ASHTIANI, S.R.; KOHRAM, H. Bio-economic evaluation of the use of sexed semen at different conception rates and herd sizes in Holstein population. *Animal Reproduction Science*, n.121, p. 17-23, 2010.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 36, p. 219-228, 2007.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de “sêmen sexado” congelado. **BR PI 0300604-2**, 17 Jun. 2003.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 1998. 89f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M., RAMALHO, M.D.T., RODRIGUES, L.H., MALHEIROS, E.B., MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V.; MOREIRA-FILHO, C.A. Bovine spermatozoa sexing by density gradient centrifugation. **Brazilian Journal of Animal Science**, 2011 (in press).

HWANG, D. H.; POOL, S. H.; RORIE, R. W.; BOUDREAU, M.; GODKE, R. A. Transitional changes in arachidonic acid metabolism by bovine embryos at different developmental stages. **Prostaglandins**, v. 35, p. 387–402, 1988.

IETS – Internation Embryo Transfer Society, Relatório Annual, 2008.

JANUSKAUSKAS, A., LUKOSEVICIUTE, K., NAGY, S., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. **Theriogenology**, v. 63, p. 160–178, 2005.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.16, p.303-326, 1994.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1323-1341, 1999.

JOHNSON, M.; NASR-ESFAHANI, M. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? **Bioessays**, v. 16, p. 31–38, 1994.

JURISICOVA, A.; LATHAM, K. E.; CASPER, R. F.; VARMUZA, S. L. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 243-253, 1998.

KAMJOO, M.; BRISON, D. R.; KIMBER, S. J. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 67-77, 2002.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 847-856, 2000.

KIMURA, K.; SPATE, L. D.; GREEN, M. P.; ROBERTS, R. M. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 201-207, 2005.

KIND, K. L.; COLLETT, R. A.; HARVEY, A. J.; THOMPSON, J. G. Oxygen-regulated expression of GLUT-1, GLUT-3, and VEGF in the mouse blastocyst. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 37-44, 2004.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H. H. D.; SCHMIDT, S. E. M.; REICHENBACH, H. D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 253-264, 2006.

KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, G.C. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v. 124, p. 365-75, 2002.

KODAMAN, P. H.; BEHRMAN, H. R. Hormone-regulated and glucose-sensitive transport of dehydroascorbic acid in immature rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 140, p. 3659-3665, 1999.

KOL, S.; BEN-SHLOMO, I.; RUUTIAINEN, K.; ANDO, M.; DAVIES-HILL, T. M.; ROHAN, R. M.; SIMPSON, I. A.; ADASHI, E. Y. The midcycle increase in ovarian glucose uptake is associated with enhanced expression of glucose transporter 3. Possible role for interleukin-1, a putative intermediary in the ovulatory process. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 2274-2283, 1997.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E-2 biosynthesis. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 633-8, 2005.

LAMBERT-LANGLAIS, S.; POINTUD, J. C.; LEFRANÇOIS-MARTINEZ, A. M. VOLAT, F.; MANIN, M.; COUDORE, F.; VAL, P.; SAHUT-BARNOLA, I.; RAGAZZON, B.; LOUISET, E.; DELARUE, C.; LEFEBVRE, H.; URADE, Y.; MARTINEZ, A. Aldo keto reductase 1 B7 and prostaglandin F2a are regulators of adrenal endocrine functions. **PLoS ONE**, v. 4, e7309.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1975-1978, 1996.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1975–1978, 1996.

LAU, M. M.; STEWART, C. E.; LIU, Z.; BHATT, H.; et al. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes and Development**, v. 8, p. 2953-2963, 1994.

LEESE, H. J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update**, v. 1, p. 63–72, 1995.

LEQUARRE, A.S.; MARCHANDISE, J.; MOREAU, B.; MASSIP, A.; DONNAY, I., Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. **Biological Reproduction**, v. 69, p. 1707–1713, 2003.

LIBBUS, B. L.; PERREAULT, S. D.; JOHNSON, L. A.; PINKEL, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. **Mutation Research**, v. 182, p. 265–274, 1987.

LICHNOVSKY, V.; KOLAR, Z.; MURRAY, P.; HLOBILKOVA, A.; CERNOCHOVA, D.; POSPISILOVA, E.; VOJTESEK, B.; NENUTIL, R. Differences in p53 and Bcl-2 expression in relation to cell proliferation during the development of human embryos. **J Clin Mol Pathol**, v. 51, p. 131-137, 1998.

LIMAYE, P. V.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 243, 147–152, 2003.

LIU, H.; TSAO, M.; CHENG, C.; WU, M.; HUANG, C.; CHEN, I. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunctional and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 21, p. 119-126, 2004.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137–52, 2006.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 159–167, 1999.

LONERGAN, P.; PEDERSEN, H. G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P. D.; FAIR, T. EVANS, A.; BOLAND, M. P. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 1096-1100, 2004.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **Reproduction and Biomedicine Online**, v. 7, p. 657–63, 2003.

LOPES, A. S.; WRENZYCKI, C.; RAMSING, N. B.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H.; LOVENDAHL, P.; GREVE, T. CALLESEN, H. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. **Theriogenology**, v. 68, p. 223–236, 2007.

LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL, G. E. Jr. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393–1405, 1999.

LUCIO, A. C. **Influência do método de separação dos espermatozoides viáveis (“swim-up”) na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal**. 2007, 90f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

LUDWIG, T.; EGGENSCHWILER, J.; FISHER, P.; D’ERCOLE, A. J.; et al. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. **Developments in Biologicals**, v. 177, p. 517-535, 1996.

MADORE, E.; HARVEY, N.; PARENT, J.; CHAPDELAIN, P.; AROSH, J. A.; FORTIER, M. A. An Aldose reductase with 20-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F_{2α} in the bovine endometrium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 11205–11212, 2003.

MAKKAR, G.; Ng H.Y.; YEUNG S.B.; HO, P.C. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 5, p. 796-802, 1999.

MATOS, L.; STEVENSON, D.; GOMES, F.; SILVA-CARVALHO, J. L.; ALMEIDA, H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p. 411–419, 2009.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; de GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 79–95, 2004.

MAXWELL, W. M.; LONG, C. R.; JOHNSON, L. A.; DOBRINSKY, J. R.; WELCH, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 433–440, 1998.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263–323, 1999.

McNUTT, T. L.; JOHNSON, L. A. Flow cytometric sorting of sperm: influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit. **Molecular Reproduction Development**, v. 43, p. 261–267, 1996.

MEIRELLES, C.; FARIA, V.R.; SOUZA, A.B.; WEISS, R.R.; SEGUI, M.S.; KOZICKI, L.E. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 98-103, 2008.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1198–1207, 1999.

MÉO, S. C. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e Expressão de genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos**. 2005, 94f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005.

MERCAN, R.; LANZENDORF, S. E.; MAYER, J. Jr.; NASSAR, A.; MUASHER, S. J.; OEHNINGER, S. The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmatic sperm injection is not affected by semen quality. **Andrology**, v. 30, p. 91-95, 1998.

MILLER, D. Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v. 56, p. 259-264, 2000.

MISTRY, H. D.; KURLAK, L. O.; WILLIAMS, P. J.; RAMSAY, M. M.; SYMONDS, M. E.; BROUGHTON PIPKIN, F. Differential expression and distribution of placental glutathione peroxidases 1, 3 and 4 in normal and preeclamptic pregnancy. **Placenta**, v. 31, p. 401-408, 2010.

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.

- MOORE, T.; REIK, W. Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 73-77, 1996.
- MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 608–614, 2009.
- MOREIRA, J. H. Cenário atual da Transferência de Embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no Mundo. **O Embrião**, n.29, p.4-7, 2006.
- MORRELL, J. M.; DRESSER, D. W. Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. **Mutation Research**, v. 224, p. 177-183, 1989.
- 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-citometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.931-40, 2007.
- MOUATASSIM, S. EL.; GUÉRIN, P.; MENEZO, Y. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, v. 5, p. 720–725, 1999.
- MUNDIN, T.C.D.; RAMOS, A.F.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; MELO, E.O.; GOMES, L.S.F.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics Molecular Research**, v. 8, p. 1398-1407, 2009.
- NICHOLAS, F.W. Genetic improvement through reproductive technology. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.205-214,1996.
- NIEMANN, H.; CARNAWATH, J. W.; KUES, W. Application of DNA array technology to mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 68 (Suppl. 1), p. 165-177, 2007.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. **Theriogenology** v. 53, p. 21–34, 2000.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNAWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 29-38, 2002.
- NISHIMOTO, H.; MATSUTANI, R.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, T.; HAYASHI, K-G.; MIYAMOTO, A.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Gene expression of glucose transporter

(GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 188, p. 111–119, 2006.

O' FLAHERTY, C., BECONI, M., BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269–275, 1997.

OEHNINGER, S.; ACOSTA, A.; VEECK, L.; SIMONETTI, S.; MUASHER, J. Delayed fertilization during in vitro fertilization and embryo transfer cycles: analysis of causes and impact on overall results. **Fertility and Sterility**, v. 52, p. 991-997, 1989.

OLIVEIRA, L. Z. **Efeitos do processo de seleção do sexo por centrifugação em gradiente de densidade na qualidade de espermatozóides bovinos**. 2009, 136f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

OSCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, p. 399-420, 1999.

PAKRASI, P. L.; JAIN, A. K. Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPAR delta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. **Placenta**, v. 29, 523–530, 2008.

PALMA, G. A.; OLIVIER, N. S.; NEUMÜLER, CH.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 37, p. 67–73, 2008.

PANI, G.; GALEOTTI, T. Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53. **Antioxidants & Redox Signaling**, p. 1-14, 2011.

PÉREZ-CRESPO, M.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADAN, A. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. **Journal of Andrology**, v.29, n.1, p.47-54, 2008.

PERINI, A. P. **Separação de espermatozóides “x” viáveis, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na produção *in vitro* de embriões destinados a criopreservação**. 2007, 56f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-6, 1994.

POYSER, N. L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. **Prostaglandins Leukotrienes Essential. Fatty Acids**, v. 53, p. 147–195, 1995.

PUGLISI, R.; VANNI, R.; GALLI, A.; BALDUZZI, D.; PARATI, K.; BONGIONI, G.; CROTTI, G.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; ALENDRI, R. In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. **Reproduction**, v.132, p.519-526, 2006.

RAHIMI, G.; ISACHENKO, E.; SAUER, H.; ISACHENKO, V.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J.; MALLMANN, P.; NAWROTH, F. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 343–349, 2003.

REKIK, W.; DUFORT, I.; SIRARD, M. A. Analysis of the gene expression pattern of bovine blastocysts at three stages of development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p.226–240, 2011.

RESENDE, M. V.; BEZERRA, M.B. ; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LÚCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and OptiPrep density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. **Ciência Animal Brasileira** (UFG), v. 10, p. 588-594, 2010a.

RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozóides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, p 260-269, 2010b.

RIEGER, D. The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 138–149, 1984.

RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A.; LONERGAN, P. Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 734-740, 2008.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589-595, 2002b.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–248, 2002a.

SAINT-DIZIER, M.; GRIMARD, B.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A. A. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine in vitro-produced embryos. **Zygote**, 2011 (in press).

SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Arachidonic-acid metabolism during early development of ovine embryos – a possible relationship to shedding of the zona-pellucida. **Prostaglandins**, v. 45, 557–69, 1993.

SCHERLE, P. A.; MA, W.; LIM, H.; DEY, S. K.; TRZASKOS, J. M. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 37086–37092, 2000.

SEIDEL JR. G.E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105 p. 129–138, 2008.

SEINO, T.; SAITO, H.; KANEKO, T.; TAKAHASHI, T.; KAWACHIYA, S.; KURACHI, H. Eight-hydroxy-2-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization–embryo transfer program. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 1184–1190, 2002.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, p. 4427–4434, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. A transferência de embriões no mundo. **O EMBRIÃO**, v.46, p.4-6, 2010.

SOPER, D. L.; MILBANK, J. B.; MIELING, G. E.; DIRR, M. J.; KENDE, A. S.; COOPER, R.; JEE, W. S.; YAO, W.; CHEN, J. L.; BODMAN, M.; LUNDY, M. W.; DE, B.; STELLA, M. E.; EBETINO, F. H.; WANG, Y.; DELONG, M. A.; WOS, J. A. Synthesis and biological evaluation of prostaglandin-F alkylphosphinic acid derivatives as bone anabolic agents for the treatment of osteoporosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4157–4169, 2001.

SPLAN, R.K.; CUNDIFF, L.V.; VAN VLECK, L.D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2272-78, 1998.

SRIVASTAVA, S. K.; RAMANA, K. V.; BHATNAGAR, A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 380–392, 2005.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, v. 121, 771–5, 2001.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G.; WU, A.; OKO, R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. **Microscopy research and technique**, v. 61, p. 362-378, 2003.

SUTOVSKY, P.; SACHATTEN, G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm egg fusion. **International Review of Cytology**, v. 195, p. 1-65, 2000.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 805–810, 2000.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal embryonic control in early development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction Development**, v. 26, p. 90-100, 1990.

TESARIK, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reproduction Biomedicine Online**, v. 10, p. 226-230, 2005.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDONZA, C. Late but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, p. 611-615, 2004.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos—a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p.263–275, 2000.

THUNDATHIL, J., GIL, J., JANUSKAUSKAS, A., LARSSON, B., SODERQUIST, L., MAPLETOFT, R., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 366–373, 1999.

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; EBSWORTH, M., MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 7-12, 2010.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, p. 939–948, 1999.

VAN SOOM, A.; MARTEUSEN, B.; LEROY, J.; de KRUIF, A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? **Reproduction Biomedicine Online**, v. 7, p. 664-670, 2003.

VAN VLECK, L. D. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In: BRACKETT, B.G., SEIDEL, G.E.,

- SEIDEL, S.M. (Ed.). **New Technologies in Animal Breeding**. Academic Press, 1981, p.221-242.
- VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E., BRANDFORD OLTENACU, E.A. **Genetics for the animal science**. New York: W.H. Freeman, cap.13, p.287-313, 1987.
- VIRRO, M.R.; KJERSTEN, M.D.; LARSON-COOK, L.; EVENSON, D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v. 81, n.5, p.1289-95, 2004.
- VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000.
- WATSON, A.J. The cell biology of blastocyst development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, p. 492–504, 1992.
- WEBER, P. C. Renal prostaglandins, kidney function and essential hypertension. **Contributions to nephrology**. v. 23, p. 83–92.
- WEIGEL, K.A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.87 (E. Suppl.): E120-E130, 2004.
- WELLS, D.; BERMÚDEZ, M.; STEUERWALD, N.; MALTER, H. E.; THORNHILL, A. R.; COHEN, J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. 343-355, 2005.
- WHITTINGTON, K.; FORD, W. C. The effect of incubation periods under 95% oxygen on the stimulated acrosome reaction and motility of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p.1053–1057, 1998.
- WILLIAMS, S. A.; BLACHE, D.; MARTIN, G. B.; FOOT, R.; BLACKBERRY, M. A. SCARAMUZZI, R. J. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. **Reproduction**, v. 122, p. 947–956, 2001.
- WILSON, M. E.; FAHRENKRUG, S. C.; SMITH, T. P. L.; ROHRER, G. A.; FORD, S. P. Differential expression of cyclooxygenase-2 around the time of elongation in the pig conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 229–237, 2002.
- WILSON, R.D.; FRICKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J.J.; PENFIELD, C.M.S.; WEIGEL, K.A. *In vitro* production of bovine embryos using sex sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, p. 1007-1015, 2006.
- WILSON, R.D.; WEIGEL, K.A.; FRICKE, P.M.; RUTLEDGE, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; MATTHEWS, D.L.; SCHUTZKUS, V.R. *In vitro* production of Holstein

embryos using sexed sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p. 776-782, 2005.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Molecular Reproduction Development**, v. 5, p. 155-171, 1993.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 8–18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 893–901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KORSAWE, K.; HADELER, K-G.; NIEMANN, H. Relative abundance of specific mRNAs in bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* employing two different culture systems. **Theriogenology**, v. 53, p. 415 (abstract), 2000.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 23– 35, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LEMME, E.; KORSAWE, K.; NIEMANN, H. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer derived pre-implantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 593– 603, 2004.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, suppl 68, p. S77-S83, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H.; Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology Reproduction**, v. 68, p. 2073–2080, 2003.

XU, J.; DU, C. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v.71, p.39-47, 2009.

XU, J.; GUO, Z.; SU,L.; et al. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2510-18, 2006.

XU, K. P.; YADAV, B. R.; RORIE, R. W.; PLANTE, L.; BETTERIDGE, K. J.; KING, W. A. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 33-43, 1992.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 53, p. 627-648, 2000.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v.27, p. 153–154, 2001.

YOUNG, L. E.; SCHNIEKE, A. E.; MCCREATH, K. J.; WIECKOWSKI, S.; et al. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. **Mechanisms of Development**, v. 120, p. 1433-1442, 2003.

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.

ZHANG, Q.; WU, W. X.; BRENNAN, J. T.; NATHANIELSZ, P. W. The expression of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin endoperoxide synthase in ovine maternal uterine and fetal tissues during late gestation and labor. **Endocrinology**, 137, 4010–4017, 1996.

ZHANG, H.; ROBERTS, D.N.; CAIRNS, B.R. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. **Cell**, v. 123, p. 219–231, 2005.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in *Igf1*^{-/-} null oocytes and follicles. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 10, p.111–117, 2000.