

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DO SEXO
FEMININO, POR SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES EM
GRADIENTE DE DENSIDADE, MODIFICAÇÕES NA
MATURAÇÃO E NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

Ana Paula Perini

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
MARÇO DE 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DO SEXO
FEMININO, POR SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES EM
GRADIENTE DE DENSIDADE, MODIFICAÇÕES NA
MATURAÇÃO E NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

Ana Paula Perini

Orientadora: Prof^a. Dr^a Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

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 Medicina Veterinária – Reprodução Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

MARÇO DE 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA PERINI – nasceu em 21 de Fevereiro de 1980 na cidade de Araxá – MG. Em março de 1999 ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia – MG. Graduou – se em 09 de Janeiro de 2004. Em Julho de 2004 especializou-se na área de “Biotecnologia da Reprodução Animal” pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em Março de 2005 iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, ao nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal e apresentou a dissertação intitulada “Separação de espermatozóides “x” viáveis, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na produção *in vitro* de embriões destinados a criopreservação”. Em março de 2008 iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, ao nível de Doutorado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal.

**“HÁ OS QUE SE QUEIXAM DO VENTO.
OS QUE ESPERAM QUE ELE MUDE.
E OS QUE PROCURAM AJUSTAR AS VELAS”**

WILLIAM G. WARD

DEDICO

Ao meu pai Ademar Perini, meu exemplo de
dedicação e amor pelo que faz e
quem nunca me deixou desistir!
Obrigada pai! Te amo!

OFEREÇO

A minha mãe Mirtes, meu porto seguro, meu exemplo do que é amor;
A minha irmã Ana Claudia pela mãe e mulher que se tornou;
A minha prima Claudia, minha grande amiga, que segue em frente, sempre;
E ao meu mais novo amor, minha sobrinha Elisa!
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou possível mais essa etapa conquistada da minha vida!

Ao meu pai Ademar, minha mãe Mirtes e minha irmã Ana Claudia por todo apoio, compreensão, amor, carinho, e incentivo que me deram durante mais essa jornada em minha vida!

A minha sobrinha Elisa que chegou esse ano em nossas vidas para alegrar o coração de todos.

Aos meus avós Pedro, Claudia e Angélica, ao meu padrinho José Antônio, madrinha Idelma e a todos os tios e tias que são muitos, graças a Deus, por fazerem parte da minha história.

Aos meus primos queridos Cris, Claudia, Juninho, Pati, Cris Tassini, Ana Cristina, Léo, Lilian, Laura, Jú, Bruno, Marina, Bia, Pedro Henrique, Luis Gustavo, Jeane e Daiane por fazerem questão da gente estar sempre juntos, quando possível, e me proporcionarem momentos alegres, engraçados, únicos, que marcam a minha vida por saber que tenho uma família maravilhosa e sempre agradeço a Deus por isso. Cris Marra, meu primo querido, sei que onde estiver está feliz por mim e sei também que está ao lado de Deus, porque ele tem as pessoas boas ao lado dele! Amo todos vocês.

A professora Vera, minha chefinha, que acreditou e confiou em mim desde o primeiro esboço do projeto deste doutorado, pelos esforços que fez para que eu conseguisse desenvolver esse trabalho e esteve ao meu lado nas horas boas e nas difíceis pelas quais passamos no laboratório durante esses 4 anos e pela amizade que temos.

Ao professor Wilter, um grande amigo, que sempre esteve pronto para me ajudar, me apoiou e por tantas vezes me disse palavras de grande sabedoria e ensinamentos que

me ajudaram a trilhar mais esse caminho em minha vida. Vou levar essas palavras sempre comigo.

A banca examinadora Juliana, Flavia, Wilter e Simone por aceitarem gentilmente participar.

Ao professor Cocão que aceitou meu pedido de participar da banca de última hora, obrigada professor, te agradeço imensamente, de coração!

Aos meus amigos do departamento Maria Emília, Ju, Naiara, Maite, Rafa, Michele, Marcelo, Kellen, Max, Gui, Flavia, Dan, Marina, Tathi, Maricy, Eli, Aracele, Giu, Diogo, Alanna, Pedro Paulo, Marcus, Marquinho, Felipe, Lu, Paulinha, pelos anos de amizade, convivência e companheirismo.

As minhas amigas bruxinhas Aline, Letícia, Carol, Dri e Verônica pelos momentos de conversas, diversão e pela ajuda que sempre me deram. Um agradecimento especial a Aline que por tantas vezes veio a Jaboticabal para me ajudar no experimento e para a Letícia pela ajuda no projeto e nos artigos.

A professora Janete Desidério e a Eliana Alves por concederem gentilmente o laboratório para algumas análises.

Um agradecimento especial também para o Rafa e o Gui pelas aspirações e transferências que me ajudaram muito nessa última fase do experimento.

Aos veterinários Douglas e Marcos pelas aspirações e transferências realizadas em Minas.

A minha estagiária Cibele que sempre esteve ao meu lado me ajudando durante todo o experimento e se tornou uma grande amiga. Tenho certeza que você vai longe.

Aos estagiários Douglas, Carol e Valéria pela ajuda.

Aos funcionários Roberta, Edson, Ivo e Bel. Especialmente a Roberta e ao Edson que sem ajuda deles com certeza teria sido muito mais difícil terminar esse experimento.

Aos amigos de Jaboticabal Andreza, Danilo, Fer, Lisi, Careca, Thiago, Kaká, Erika, Marcelo, Larissa, Mirela, Ana Paula, Nel, Cris, Alexandre, Vanessa, Gil, Rose, João, Andreia, Renata pelos momentos de alegria e descontração que são muito importantes em minha vida.

Ao CNPq pela bolsa concedida e apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1.INTRODUÇÃO.....	18
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.Fatores que afetam o desvio da proporção sexual em embriões produzidos <i>in vitro</i>	22
2.1.1.Influência dos espermatozóides no desvio da proporção sexual.....	23
2.1.2.Influência do sistema de maturação de oócitos no desvio da proporção sexual.....	24
2.1.3.Influência do meio de cultivo dos embriões no desvio da proporção sexual.....	25
2.2.Acuidade na sexagem compatível com a manutenção de taxas de prenhez que denotem a viabilidade espermática e a viabilidade embrionária.....	26
3.HIPÓTESE.....	28
4.OBJETIVOS.....	29
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1.EXPERIMENTO 1.....	30
5.1.1.Produção <i>in vitro</i> dos embriões do grupo controle (GRUPO I).....	31
5.1.2.Produção <i>in vitro</i> dos embriões dos grupos experimentais.....	34
5.1.3.Coleta dos Embriões.....	38

5.1.4.Determinação do sexo dos embriões por PCR.....	39
5.1.5.Forma de análise dos resultados.....	41
5.2.EXPERIMENTO 2.....	41
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1.EXPERIMENTO 1.....	45
6.1.1.Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	48
6.2.EXPERIMENTO 2.....	57
7.CONCLUSÕES.....	59
8.REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Classificação dos grupos em relação a maturação dos oócitos, incubação do sêmen e gradiente de sexagem.	31
TABELA 2. Média da avaliação dos parâmetros concentração, motilidade e vigor do sêmen em 5 repetições, dos touros da raça Girolando e Gir, dos grupo I (Controle), II (Maturação 18 horas) e IV (Gradiente de sexagem).	45
TABELA 3. Avaliação do sêmen antes da FIV, das duas repetições feitas, do grupo III (Incubação) quanto aos parâmetros de concentração, motilidade e vigor, antes e depois da incubação em estufa de CO ₂ por 12 horas.	46
TABELA 4. Avaliação do sêmen antes da FIV, das duas repetições, do grupo V (Múltiplos tratamentos) quanto aos parâmetros de concentração, motilidade e vigor, antes e depois da incubação por 12 horas e depois da centrifugação em gradiente de sexagem.	47
TABELA 5. Total de oócitos, números de estruturas cultivadas, porcentagem de embriões clivados e total de embriões produzidos em seis tratamentos para produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.	48
TABELA 6. Porcentagem de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , machos e fêmeas, dos seis tratamentos realizados	50
TABELA 7. Porcentagem de machos e fêmeas por estadio de desenvolvimento em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos.	56
TABELA 8. Vacas aspiradas, total de oócitos viáveis, estruturas para o cultivo, porcentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> com oócitos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom em Frutal, Sacramento e Monte Alto	57
TABELA 9. Porcentagem de prenhez após a transferência de embriões produzidos <i>in vitro</i> das três aspirações, bem como a	58

porcentagem de embriões fêmeas e machos diagnosticada pela sexagem fetal aos 60 dias de gestação.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Laboratório de cultivo celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp Campus Jaboticabal.	30
FIGURA 2. Oócitos grau I (A); oócitos grau II (B); oócitos grau III (C). Unesp Câmpus Jaboticabal.	32
FIGURA 3. Oócitos atrésicos (A); oócitos desnudos(B).Unesp Câmpus Jaboticabal.	32
FIGURA 4. Sêmen bovino em incubação em meio FIV, sem heparina, em estufa com atmosfera com 5% de CO ₂ . Unesp Campus Jaboticabal.	35
FIGURA 5. Preparação do Gradiente de sexagem (A); Sêmen bovino depositado sobre o gradiente (B). Unesp Campus Jaboticabal.	37
FIGURA 6. Sedimento de espermatozóides de bovinos formado após centrifugação em gradiente de sexagem. Unesp Câmpus Jaboticabal.	37
FIGURA 7. Blastocistos Iniciais (A); Blastocistos (B); Blastocistos Expandidos (C) de bovinos produzidos <i>in vitro</i> . Unesp Câmpus Jaboticabal.	39
FIGURA 8. Visualização do gel de agarose após eletroforese demonstrando as bandas que determinam o sexo dos embriões.	40
FIGURA 9. Doadoras utilizadas nas aspirações. Fazenda São Sebastião, Sacramento, Minas Gerais.	42
FIGURA 10. Aparelho de ultrassom utilizado nas aspirações. Fazenda São Sebastião, Sacramento, Minas Gerais.	42
FIGURA 11. Imagem de sexagem fetal por ultrassom de uma fêmea. Imagem de arquivo de Rafael Erli cedida gentilmente.	44
FIGURA 12. Imagem de sexagem fetal por ultrassom de um	44

macho. Imagem de arquivo de Rafael Erli cedida gentilmente.

LISTA DE ABREVIATURA

BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BSA	Albumina Sérica Bovina
BX	Blastocisto Expandido
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HEPES	N(2-Hydroxethyl)piperazine –N` (ethanesulfonic acid)
HSOF	Fluido Sintético de Oviduto com Hepes
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
Mo	Mórula
MOTE	Múltiplas Ovulações e Transferência de Embriões
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SE	Solução Estoque
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
TCM	Meio para Cultivo de Tecidos

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DO SEXO FEMININO POR
SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES EM GRADIENTE DE DENSIDADE,
MODIFICAÇÕES NA MATURAÇÃO E NA FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

RESUMO - Foram estudadas modificações feitas no tempo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, incubação dos espermatozóides e separação dos mesmos por gradiente de densidade de Percoll™, bem como a associação dessas técnicas antes da fecundação para que se consiga desviar a proporção sexual dos embriões para fêmeas. O controle de qualidade foi feito em cada etapa dos procedimentos avaliando-se os parâmetros de motilidade, vigor e concentração dos espermatozóides, bem como taxa de clivagem e produção *in vitro* dos embriões. A proporção sexual foi avaliada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e por transferências de embriões em receptoras. Pela técnica da PCR concluiu-se que a incubação dos espermatozóides em meio FIV sem heparina por 12 horas, desviou 59% o sexo dos embriões para fêmeas, a diminuição do tempo de maturação não desviou e essas duas técnicas associadas a centrifugação em gradiente não aumentaram o desvio da proporção sexual, porém o gradiente de sexagem foi eficaz em sexar 64% dos espermatozóides para fêmeas. Obteve-se uma taxa média de prenhez de 36,73% e uma proporção de fêmeas de 88,88% com embriões produzidos a partir da associação da redução no tempo de maturação dos oócitos ao gradiente de sexagem.

Palavras chave: incubação de espermatozóides, gradiente de sexagem, produção *in vitro* de embriões, maturação, reação em cadeia da polimerase, transferência de embriões.

IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS BY FEMALE SEXING OF SPERM IN DENSITY GRADIENT, CHANGES IN MATURATION AND IN VITRO FERTILIZATION

SUMMARY - were studied modifications made at the time of *in vitro* maturation of oocytes, sperm incubation and separation thereof by density gradient Percoll™ as well as the combination of these techniques prior to fertilization to be able to divert the sex ratio of embryos females. Quality control was done at each stage of the procedures by evaluating the parameters of motility, vigor and concentration of spermatozoa and rate of cleavage and *in vitro* production of embryos. The sex ratio was assessed by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) and embryo transfer into recipients. By the technique of PCR it was found that incubation of spermatozoa in IVF medium without heparin for 12 hours, 59% deviated sex of embryos for females, the reduction time of maturation is not shifted and associated with these two techniques do not increase the deviation of the sex ratio by gradient centrifugation, but the gradient was effective in sexing 64% of sperm to females. We obtained a mean pregnancy rate of 36.73% and a ratio of 88.88% of females with embryos produced from the combination of the reduction in the time of oocyte maturation to the gradient of sexing.

Keywords: incubation of sperm sexing gradient, *in vitro* embryo production, maturation, polymerase chain reaction, embryo transfer.

1.INTRODUÇÃO

Em bovinos a seleção do sexo tem valor econômico e genético significativos nos animais de interesse zootécnico. Principalmente quando utilizada em programas de melhoramento associada à inseminação artificial com tempo fixo (IATF) e à produção *in vitro* de embriões (PIVE), nos sistemas em que a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (SPLAN et al., 1998; HOHENBOKEN, 1999). Desde que a metodologia utilizada não diminua a eficiência reprodutiva (WEIGEL, 2004).

A seleção de espermatozoides portadores do cromossomo X é muito importante, principalmente em sistemas de produção de leite. Ao utilizar sêmen enriquecido com espermatozoides X em rebanhos leiteiros, há o aumento do número de fêmeas disponíveis para reposição e, conseqüentemente, da produção (LUCIO, 2007).

Apesar de seu amplo uso, a PIVE ainda apresenta limitações e a principal delas é o sistema de cultivo que favorece o desenvolvimento de um número maior de embriões do sexo masculino (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001, 2004). 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 espermatozoides sexados para o sexo feminino pelo método de citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica que garante 90% de acuidade, porém causa danos na viabilidade espermática, o que leva a baixa taxa de prenhez após os 90 dias da IA (média de 30%) e, conseqüentemente, 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; SEIDEL e SCHENK, 2008; BORCHERSEN e PEACOCK, 2009). Na PIVE também ocorre baixa taxa de prenhez (média de 27%) que acarreta a produção de apenas 3 fêmeas por cada 100 oócitos fecundados, quando comparado com o sêmen convencional, que permite em média 40% de prenhez e 5 fêmeas nascidas a cada 100 oócitos fecundados (WILSON et

al., 2005, 2006; XU et al., 2006; XU e DU, 2009). Além do preço elevado da dose do sêmen sexado devido ao alto custo de produção (WEIGEL, 2004; DE VRIES et al., 2008).

Em bovinos, a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™ pode ser utilizada como uma alternativa à citometria de fluxo e separa, com acuidade de até 73%, populações de espermatozoides X. Quando estes espermatozoides 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 et al.; HOSSEPIAN DE LIMA 2007; HOSSEPIAN DE LIMA et. Al., 2011). Esta técnica tem como vantagem a separação de sêmen congelado e *in natura* e é capaz de selecionar espermatozoides morfológicamente 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 et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011). 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 espermatozoides.

Atualmente, não existe disponível comercialmente uma técnica capaz de separar espermatozoides com 100% de eficácia e que garanta a eficiência reprodutiva do rebanho. Entretanto, um aumento na taxa de produção de fêmeas, quando se associa ao gradiente de sexagem algumas modificações no sistema de PIVE, como exemplo diminuição no tempo de maturação *in vitro* e também a incubação de espermatozoides antes da fecundação, é muito vantajoso para produtores que visam vender a genética dos animais de produção leiteira, tanto machos quanto fêmeas, principalmente porque esse sistema de PIVE diminui os danos causados aos espermatozoides e embriões quando comparados com a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo.

Com base nessas afirmações a hipótese testada nesse trabalho é que a centrifugação de sêmen convencional em gradiente de densidade, associada a modificações no sistema de PIVE pode produzir mais que 65% de fêmeas.

2.REVISÃO DE LITERATURA

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 (IETS) 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). Atualmente, existe demanda de fêmeas mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) para a produção de leite, pois cerca de 70% da produção de leite no Brasil provém de vacas mestiças. A raça Holandesa predomina nos cruzamentos, sendo que o mais comum é o de Holandês com o Gir, mais conhecido como "Girolando" (CARVALHO, et al., 2009).

A técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos, embora apresente algumas limitações de seu uso, no Brasil tornou-se uma realidade comercial que movimenta uma cadeia produtiva que fatura milhões todos os anos (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, 2004);

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

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON e WELSH, 1999). Em bovinos, essa diferença chega à cerca de 4,0 % (GARNER e SEIDEL, 2008) que resulta em diferenças no volume da cabeça (VAN MUNSTER et al., 1999a) e na densidade de 7×10^{-4} g/cm³ (0,06%) entre os

espermatozoides X e Y (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999). Com base nessas diferenças, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozoides: a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade.

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, 2008). Assim, tomando como exemplo os Estados Unidos e considerando a produção de sêmen sexado de todos os citômetros existentes no país, a venda deste sêmen representa menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado (WEIGEL et al., 2004). Isso ocorre devido aos seguintes fatos:

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

b) os espermatozoides descongelados (sêmen convencional) têm a viabilidade diminuída significativamente quando são sexados pela citometria de fluxo (UNDERWOOD et al., 2010). A utilização de espermatozoides 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).

c) 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%), indicando que a citometria de fluxo compromete a capacidade fecundante dos espermatozoides (PALMA, et al., 2008).

Portanto, tem-se estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos de sexagem de espermatozoides (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). Entre 1993 e 2008, nosso grupo desenvolveu gradientes considerando as características dos espermatozoides bovinos (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; PERINI, 2007; RESENDE et al., 2009; LUCIO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

A centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™ para a seleção do sexo em espermatozóides, que tem acuidade de 65%, permite menor número de danos espermáticos quando comparada com o método da citometria de fluxo (OLIVEIRA et al., 2011).

Outra vantagem importante para a indústria da PIVE que é atendida por essa técnica é a possibilidade da sexagem de sêmen convencional descongelado. Nesse caso substitui-se, durante o processo da PIVE, a técnica de 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 espermatozoides viáveis e seleção de 65%, em média, de espermatozóides X, sem diminuir significativamente a taxa de prenhez.

2.1.Fatores que afetam o desvio da proporção sexual em embriões produzidos *in vitro*

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., 2006).

Vários estudos em embriões bovinos produzidos *in vitro* sugerem que a proporção sexual difere de 1:1 e que a taxa de desenvolvimento pode ser influenciada pelo sexo do embrião sob algumas condições de cultivo. Este fenômeno não é claramente entendido, entretanto, pode ser atribuído a eventos que ocorrem antes da fecundação que favorecem a seleção dos espermatozóides X ou Y. Além disso, análises dessas duas populações de gametas têm mostrado algumas diferenças funcionais e morfológicas entre elas e não se sabe se têm a mesma viabilidade *in vitro* (LECHNIAK et al., 2003). Dessa forma é necessário estudar alguns fatores que podem desviar o sexo dos embriões produzidos *in vitro*.

2.1.1. Influência dos espermatozóides no desvio da proporção sexual.

A vida fértil (longevidade) dos gametas é espécie específica e parece ser um dos principais fatores que regulam a eficiência do processo de fecundação. *In vivo* os espermatozóides bovinos possuem uma vida fértil de 30 a 48 horas enquanto a do oócito varia de 8 a 12 horas. Entretanto este último pode reter a capacidade de ser fecundado por um período mais longo, acima de 20 a 24 horas, mas a fecundação normal pode ser comprometida (LECHNIAK et al., 2003).

Demonstrou-se que o tempo de interação entre os espermatozóides com os oócitos é também um fator determinante na proporção sexual de embriões produzidos *in vitro*. A redução da incubação do oócito com o espermatozóide de 18 para 6 horas resulta em uma mudança significativa da proporção sexual em favor dos machos entre os blastocistos no dia 7 de desenvolvimento *in vitro*, concluindo-se que o espermatozóide Y tem uma vantagem em relação ao X em fecundar mais precocemente (KOCHHAR et al., 2001).

LECHNIAK et al. (2003) demonstraram que uma incubação por 24 horas dos espermatozóides, em meio de fecundação antes da mesma, influenciou na taxa de desenvolvimento e na proporção sexual dos embriões em favor das fêmeas (75% de fêmeas) quando estes foram sexados no dia 9 após a fecundação. A predominância de fêmeas seguida de uma pré-incubação dos espermatozóides sugere que os espermatozóides X possuem uma maior longevidade em relação aos Y. E quanto maior o tempo de incubação, menor a capacidade de fecundação dos espermatozóides devido ao estresse oxidativo e à produção de radicais livres que afetam a sua sobrevivência, e parecem afetar mais os espermatozóides Y que os X.

Espermatozóides incubados *in vitro* sob alta tensão de O₂ produzem peróxidos de hidrogênio que causam danos à viabilidade espermática. O estresse oxidativo prejudica a motilidade espermática porque os peróxidos produzidos danificam a membrana plasmática que perde sua fluidez e, conseqüentemente, leva à perda da função do espermatozóide (AITKEN et al., 2001).

2.1.2. Influência do sistema de maturação de oócitos no desvio da proporção sexual.

Em bovinos outra forma de selecionar o sexo no momento da fecundação foi sugerida por RORIE (1999). Existem evidências que suportam a habilidade diferencial do oócito ser fecundado por espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y dependendo do seu estágio de maturação. Utilizando fecundação *in vitro* os autores demonstraram que quando a fecundação ocorreu após 16 horas de maturação (imediatamente após a extrusão do primeiro corpúsculo polar), a proporção de machos em relação às fêmeas foi de 0,5:1. Por outro lado, quando a fecundação ocorreu 24 horas após a maturação (8 horas após a extrusão do corpúsculo polar), a proporção de machos e fêmeas foi de 2:1 (RORIE, 1999).

Da mesma forma, AGUNG et al. (2006) testaram o período de maturação de oócitos na proporção sexual de embriões bovinos fecundados *in vitro*. Os oócitos foram maturados por 16, 22, 28 e 34 horas. A taxa de blastocistos foi maior no grupo de oócitos que foram maturados por 22 horas e a taxa de embriões do sexo masculino foi maior no grupo com 34 horas de maturação que naqueles com 16 e 22. Portanto a proporção de machos aumentou de acordo com o aumento de horas de maturação dos oócitos.

Também DOMINKO e FIRST (1997) e GUTIÉRREZ-ADÁN et al., (2001) encontraram que a fecundação dos oócitos imediatamente após a extrusão do corpúsculo polar resultou em mais embriões do sexo feminino, enquanto que o atraso na fecundação por 8 horas resultou em um maior número de machos. Eles sugerem que o oócito processa mais facilmente o espermatozóide Y quando atinge o estágio de meiose II, por isso o atraso na fecundação favorece um número maior de embriões do sexo masculino.

2.1.3. Influência do meio de cultivo dos embriões no desvio da proporção sexual.

As condições de cultivo dos embriões possuem um papel chave na clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação, diferenciação, assim como desenvolvimento e viabilidade fetal (MOORE et al., 2007). Alguns estudos demonstraram uma associação entre substâncias presentes no meio de cultura com a proporção sexual e as taxas de desenvolvimento. Dentre os componentes que poderiam influenciar essas taxas, estaria o soro fetal bovino (SFB) e a glicose. Meios de cultura com esses componentes favoreceriam o desenvolvimento mais rápido dos embriões do sexo masculino que seriam mais estimulados por eles do que os embriões do sexo feminino (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001).

Larson et al. (2001) demonstraram que na presença de glicose, mais de 75% dos blastocistos produzidos em meio SOF (fluido sintético de oviduto) eram machos. O meio SOF contendo SFB não só acelerou a taxa de desenvolvimento como também aumentou a sobrevivência dos embriões do sexo masculino (GUTIERREZ-ADÁN et al., 2001). A suplementação do meio de cultivo com SFB, em excesso, tem sido associada com a formação de gotas lipídicas citoplasmáticas em embriões produzidos *in vitro* (ABE et al., 1999), indução de alterações na expressão de alguns genes, indução no desenvolvimento dos embriões do sexo masculino, redução da sobrevivência embrionária após transferência, além de causar problemas mais tardios de desenvolvimento como a síndrome do bezerro gigante (MOORE et al., 2007).

Comparado com as células somáticas, o metabolismo de energia dos embriões é muito diferente. A glicose é a principal fonte de energia para as células somáticas dos mamíferos, mas a presença dela na concentração em que se encontra no SFB é prejudicial para embriões de várias espécies durante os primeiros estágios do desenvolvimento. Altas concentrações de glicose não só prejudicam o desenvolvimento de embriões bovinos, como também bloqueiam, seletivamente, o desenvolvimento daqueles do sexo feminino durante a transição de mórula para blastocisto e, conseqüentemente, desviam a proporção sexual em favor dos machos entre os blastocistos expandidos (KIMURA et al., 2004). A melhor explicação para esse

fenômeno é que os dois cromossomos X estão ativos nas fêmeas e como ocorre a inativação em um deles, isso leva a uma baixa tolerância do metabolismo dos carboidratos (KIMURA et al., 2008).

2.2.Acuidade na sexagem compatível com a manutenção de taxas de prenhez que denotem a viabilidade espermática e a viabilidade embrionária.

Após a sexagem de espermatozóides por gradiente de densidade na produção *in vitro* de embriões, obteve-se taxa média de 40% de prenhez e média de 8 fêmeas nascidas a cada 100 oócitos fecundados (65% de acuidade) (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA et al., BR PI 0300604-2, 2003; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; RESENDE et al., 2010a; LUCIO et al., 2012). Após a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo na PIVE obteve-se taxa média de prenhez de 27% e média de 3 fêmeas nascidas a cada 100 oócitos fecundados (WILSON et al., 2006; XU et al., 2006; PALMA et al., 2008; BLONDIN et al., 2009). 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), o que explicaria as baixas taxas de prenhez.

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 e DRESSER, 1989; GARNER, 2009) alterações no padrão de motilidade espermática, 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., 2010).

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).

LUCIO et al., (2011) avaliaram os efeitos sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade e da citometria de fluxo em blastocistos na abundância de transcritos dos genes AKR1B1, COX2, IGF2R, PLAC8 (desenvolvimento de placenta e reconhecimento da gestação), MnSOD e GPX1 (estresse oxidativo), SCL2A1 (metabolismo) e TP53 (apoptose). Os resultados mostraram que a citometria de fluxo reduz os níveis de mRNA dos genes AKR1B1 e COX2, ou seja, alterou a expressão de genes envolvidos no processo de implantação, prejudicando o nascimento de uma cria viável. A centrifugação em gradiente de densidade, por sua vez, aumentou os níveis de transcritos dos genes envolvidos com reconhecimento da gestação, formação da placenta, resposta a estresse oxidativo e metabolismo celular, ou seja, produziu embriões de melhor qualidade. LUCIO et al., (2011) concluiu 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*. Entretanto, a sexagem por citometria de fluxo é uma realidade comercial e estudos de transcriptoma dos espermatozóides e embriões poderão auxiliar no aprimoramento da técnica, para melhorar as taxas de concepção a campo, tanto na IA como na PIVE.

3.HIPÓTESE

De acordo com os relatos da revisão de literatura da presente tese e com os trabalhos realizados no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp Jaboticabal, levanta-se a seguinte hipótese:

A centrifugação de sêmen convencional descongelado em gradiente de densidade, associada à diminuição do tempo de maturação de oócitos e à incubação dos espermatozoides antes da fecundação pode produzir mais que 65% de fêmeas em um sistema de produção *in vitro* de embriões de bovinos

4.OBJETIVOS

- Aumentar a acuidade de sexagem acima de 65% de fêmeas aliando-se à técnica do gradiente de sexagem, a diminuição no tempo de maturação dos oócitos de 24 para 18 horas e a incubação do sêmen por 12 horas antes da fecundação, sem diminuir a taxa de clivagem e de blastocistos;
- Avaliar a taxa de prenhez e o desvio da proporção sexual após a transferência de embriões produzidos *in vitro* com oócitos maturados por 18 horas e fecundados com espermatozóides centrifugados em gradiente de sexagem.

5.MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas desse experimento foram realizadas no laboratório de cultivo celular do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp Campus de Jaboticabal (FIGURA 01).



FIGURA 1. Laboratório de cultivo celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Unesp Campus Jaboticabal.

5.1.EXPERIMENTO 1

O experimento 1 compreende a produção *in vitro* de embriões e a validação da proporção do sexo dos embriões pela técnica de PCR. Este experimento foi dividido em 5 grupos experimentais, além do controle, e foram classificados da seguinte forma:

TABELA 1. Classificação dos grupos em relação a maturação dos oócitos, incubação do sêmen e gradiente de sexagem.

GRUPO	MATURAÇÃO DOS OÓCITOS	INCUBAÇÃO DO SÊMEN	GRADIENTE DE SEXAGEM
I-CONTROLE	24 horas	Não	Não
II-MATURAÇÃO 18 HORAS	18 horas	Não	Não
III-INCUBAÇÃO ESPERMÁTICA	24 horas	Incubação 12 horas	Não
IV-GRADIENTE DE SEXAGEM	24 horas	Não	Sim
V-MÚLTIPLOS TRATAMENTOS	18 horas	Incubação 12 horas	Sim
VI-MATURAÇÃO ASSOCIADA AO GRADIENTE	18 horas	Não	Sim

A incubação do sêmen foi feita em meio FIV sem heparina e o cultivo dos embriões de todos os grupos foi feito em meio SOF sem SFB e glicose, somente com BSA, em atmosfera com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C;

5.1.1. Produção *in vitro* dos embriões do grupo controle (GRUPO I)

Aspiração folicular de ovários provenientes de matadouros

No dia considerado dia 0, ovários fornecidos por abatedouros foram transportados para o laboratório em garrafa térmica contendo solução fisiológica em temperatura entre 30-33°C. No laboratório eles foram lavados em solução fisiológica a 35°C e colocados em um recipiente de vidro, previamente aquecido em banho maria, e

permaneceram até o momento da aspiração. Os folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 19 G acoplada a seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubos cônicos de 50 mL que ficavam na estufa por 15 minutos para que os oócitos sedimentassem. O sedimento foi transferido para placa de poliestireno de 90mm de diâmetro e avaliados em microscópio estereoscópico. Foram selecionados os oócitos com pelo menos 4 camadas de células do cúmulus e ooplasma de coloração uniforme, ou seja, somente oócitos graus 1, 2 e 3 (FIGURA 02). Oócitos considerados desnudos e atrésicos foram descartados (FIGURA 03).

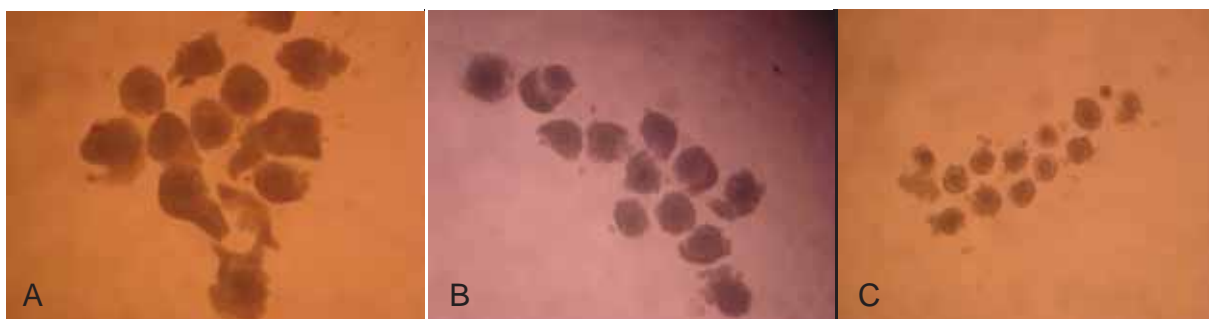


FIGURA 2. Oócitos grau I (A); oócitos grau II (B); oócitos grau III (C). Unesp Câmpus Jaboticabal.

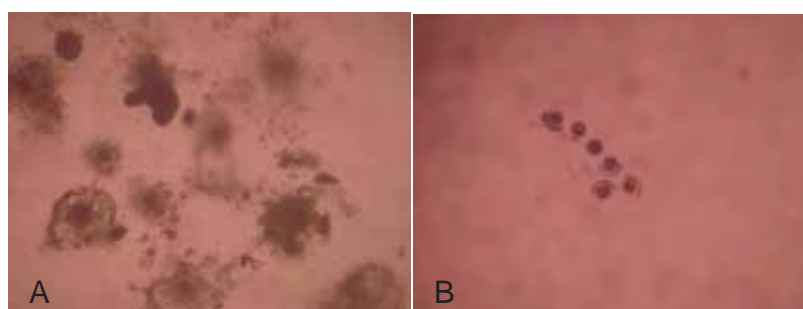


FIGURA 3. Oócitos atrésicos (A); oócitos desnudos(B).Unesp Câmpus Jaboticabal.

Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos 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/mL de Kanamicina) e uma vez em meio de maturação 199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg/mL de Kanamicina, 1 µg/mL de 17-β Estradiol, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG) acrescido de 10% de SFB. Todos os meios foram preparados no dia da aspiração.

Placas de poliestireno de 35mm foram previamente preparadas, em cada placa foram feitas 5 gotas de 100µl de meio de maturação e cobertas com óleo mineral testado para cultura de células. Foram transferidos no máximo 25 oócitos por gota. Estes foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Fecundação *in vitro* (FIV)

Para a separação dos espermatozóides viáveis para fecundação uma palheta de sêmen congelado em nitrogênio líquido foi descongelada em água por 30 segundos a 37°C e depositada sobre um gradiente de Percoll™ (45%/90%), à temperatura ambiente e centrifugado a uma força de 900 x g durante 30 minutos.

Os oócitos maturados foram lavados uma vez em meio TL-sêmen e uma vez no meio FIV e transferidos para placas previamente preparadas com este último meio, como na maturação. Do sedimento espermático resultante da centrifugação foram retiradas duas amostras de 5 µl para determinar a motilidade progressiva e a concentração, que foi ajustada para 5 mil espermatozóides por oócito. O sêmen foi depositado na gota e os gametas co-incubados em estufa por aproximadamente 20 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, na temperatura de 38,5°C.

Cultivo *in vitro* (CIV)

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 meio TL-sêmen e duas vezes em meio de cultivo (SOF) para que ficassem totalmente desnudos, após a limpeza foram transferidos para placas com quatro poços contendo 500µL de SOF sem SFB e sem glicose. Foram cultivados no máximo 80 zigotos por poço em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C. A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados 24 horas e oito dias após a fecundação, respectivamente.

5.1.2. Produção *in vitro* dos embriões dos grupos experimentais.

GRUPO II - Maturação 18 horas

Nesse grupo as etapas da PIVE foram feitas exatamente como no grupo controle, diferenciando apenas no tempo de maturação dos oócitos que foi reduzido de 24 para 18 horas.

GRUPO III - Incubação Espermiática

Nesse grupo a maturação e o cultivo foram feitos exatamente como no grupo controle.

Para a realização da FIV uma palheta de sêmen foi descongelada e o sêmen avaliado quanto à motilidade, à concentração e ao vigor, centrifugada duas vezes em meio TL-sêmen por cinco minutos a 500 rpm para a retirada do crioprotetor. Após a limpeza, o sêmen foi depositado em 10 ml de meio FIV, sem heparina, e incubado em estufa a 38°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 12 horas (FIGURA 04). Decorrido esse período o sêmen foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm para se obter um sedimento de espermatozoides. O sobrenadante foi retirado, o sêmen avaliado

novamente quanto à motilidade, à concentração e ao vigor, e ao sedimento foi adicionado meio FIV, com heparina, suficiente para fecundar todas as gotas.

Os oócitos, após lavagem, foram transferidos para as placas de FIV que foram montadas com gotas de 30 μ l, em cada gota foram adicionados 10 μ l do sêmen.



FIGURA 4. Sêmen bovino em incubação em meio FIV, sem heparina, em estufa com atmosfera com 5% de CO₂. Unesp Campus Jaboticabal.

GRUPO IV - Gradiente de Sexagem

Nesse grupo a maturação e o cultivo foram feitos exatamente como no grupo controle. Para a realização da FIV foi feito o gradiente de sexagem.

O gradiente foi preparado com duas soluções estoques de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), o DMEM 10X e 1X concentrados.

O DMEM concentrado 10X foi preparado diluindo-se a quantidade de reagente necessária para fazer um litro, em 100 mL de água ultra pura do Sistema Milli Q bidestilada. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana com poros de 0,22 μ e estocada a temperaturas entre 4 e 6°C por até 15 dias.

O DMEM concentrado 1X foi preparado conforme as recomendações do

fabricante. Em seguida essa solução foi filtrada em membrana com poros de 0,22 μ e estocada a temperaturas entre 4 e 6°C por até 15 dias.

Uma solução estoque (SE) foi preparada diluindo-se 9 partes de sílica coloidal modificada (Percoll™, densidade 1,130 g/mL) em 1 parte de DMEM 10X (densidade 1,058 g/mL; 1:9, v/v) complementado com 0,01 g/L de amicacina, 6mM de HEPES; pH 7,4; 280-320 mOsm/kg de H₂O.

A SE foi diluída na solução de DMEM 1X em 3 diferentes proporções. O gradiente foi preparado depositando-se 3 mL de cada uma das 3 soluções, da mais densa (1,123 g/mL) para a menos densa (1,111 g/L), em tubo cônico de poliestireno, graduado e com capacidade para 15 mL, com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável e mecanismo de reservatório para distribuição automática (FIGURA 05 – A). O volume final do gradiente foi de 9 mL.

Duas palhetas de sêmen foram descongeladas, o sêmen avaliado quanto a concentração, motilidade e vigor, e depositadas sobre o gradiente (FIGURA 05 – B), este foi centrifugado em centrífuga refrigerada com rotor horizontal em 500 x g, por 15 minutos, a 22 °C. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável e o sedimento formado (FIGURA 06) foi avaliado novamente quanto a concentração, motilidade e vigor e diluído em meio FIV suficiente para fecundar as gotas com 10 μ L. As placas de FIV foram feitas como no grupo III.

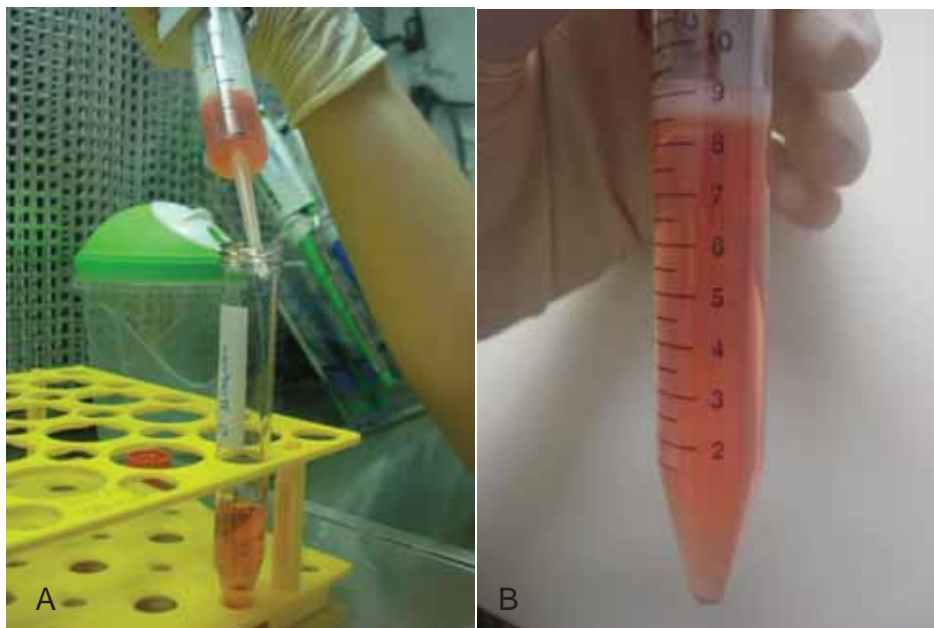


FIGURA 5. Preparação do Gradiente de sexagem (A); Sêmen bovino depositado sobre o gradiente (B). Unesp Campus Jaboticabal.

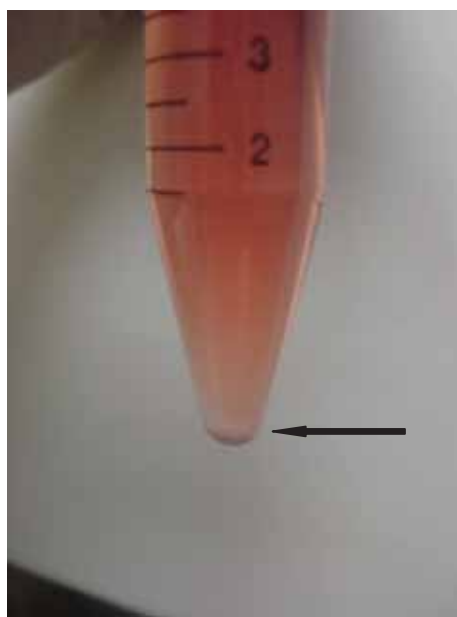


FIGURA 6. Sedimento de espermatozóides de bovinos formado após centrifugação em gradiente de sexagem. Unesp Campus Jaboticabal.

GRUPO V - Múltiplos tratamentos

Esse é a junção dos 3 grupos experimentais. Nele foram feitos a maturação por 18 horas, incubação dos espermatozoides por 12 horas e após a incubação os espermatozoides foram submetidos ao gradiente de sexagem. O cultivo foi feito como no grupo controle.

GRUPO VI - Maturação associada ao Gradiente de Sexagem

Esse grupo é a associação dos dois grupos que produziram maior número de embriões. Nele foi feita a maturação por 18 horas e o sêmen foi centrifugado no gradiente de sexagem, a FIV foi feita como no grupo IV e o cultivo foi feito como no grupo controle.

5.1.3. Coleta dos Embriões

No oitavo dia de cultivo de cada repetição, os embriões foram avaliados quanto a qualidade e ao estadio de desenvolvimento - Morula (Mo), Blastocisto inicial (BI), Blastocisto (BL) e Blastocito expandido (BX) - e coletados (FIGURA 07). Eles foram retirados dos poços de cultivo e transferidos para uma gota de meio TL-sêmen, nesta gota foram separados quanto ao estágio de desenvolvimento em grupos. Cada grupo foi lavado duas vezes em TL-sêmen para que todas as células ainda restantes na zona pelúcida se soltassem. Cada embrião foi coletado com o auxílio de uma pipeta ajustada para 5 µl e colocado individualmente em microtubos de 0,2 ml. Após este procedimento todos os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por aproximadamente 15 segundos para a congelação dos embriões e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA.

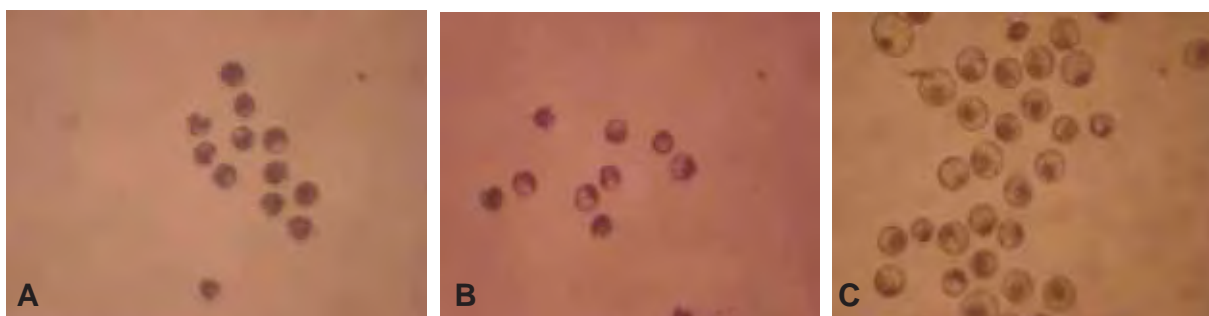


FIGURA 7. Blastocistos Iniciais (A); Blastocistos (B); Blastocistos Expandidos (C) de bovinos produzidos *in vitro*. Unesp Campus Jaboticabal.

5.1.4. Determinação do sexo dos embriões por PCR

Nesta etapa do experimento foram escolhidos aproximadamente 100 embriões de cada grupo, entre BI, BL e BX, e submetidos a PCR para a verificação do sexo de cada um.

O sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* foi identificado por PCR utilizando-se dois pares de diferentes oligonucleotídeos iniciadores "primers" que amplificam seqüências específicas do cromossomo Y, presente no DNA genômico de bovinos do sexo masculino (XY), e um par de "primers" com o controle do DNA genômico dos bovinos, conforme descrito por ALVES et al. (2003).

Os dois pares de "primers" escolhidos para a seqüência específica do cromossomo Y foram: "Primer" 1: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3'; "Primer" 2: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'. O "primer" 1 amplificou uma seqüência de 210 pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI et al., 1989) e o "primer" 2 amplificou uma seqüência de 196 pb em machos (LUZ et al., 2000). Foi utilizado um "primer" específico para o DNA bovino: "primer" 3 - 5' - AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e 5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'. Este "primer" amplificou uma seqüência de 280 pb, repetida no genoma bovino (ELLIS e HARPOLD, 1986; ELLIS et al. 1988).

Antes da PCR, foi adicionado 5µg de Proteinase K por embrião e submetidos a uma incubação de 37°C por 60 minutos. Logo após, o DNA de cada embrião foi dividido em duas amostras e submetido a duas reações distintas: a primeira contendo a seqüência autossômica (280pb) e a Y-específica (210pb); a segunda reação composta por outra seqüência Y-específica (196pb).

As amplificações foram realizadas em Termociclador PTC - 100 (M.J. Research, Inc. - Waltham, M.A. - USA). Os produtos das amplificações foram submetidos a eletroforese em gel de 2,5% de agarose, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Os embriões foram identificados como fêmeas quando somente o produto de 280 pb foi visualizado. A presença de duas bandas (280 e 210 pb) na amostra indicou que os embriões eram do sexo masculino (FIGURA 08). Este resultado foi confirmado somente quando uma banda de 196 pb foi visualizada na segunda reação. Os géis foram analisados utilizando-se equipamento de documentação fotográfica STRATAGENE (Eagle Eye Software).

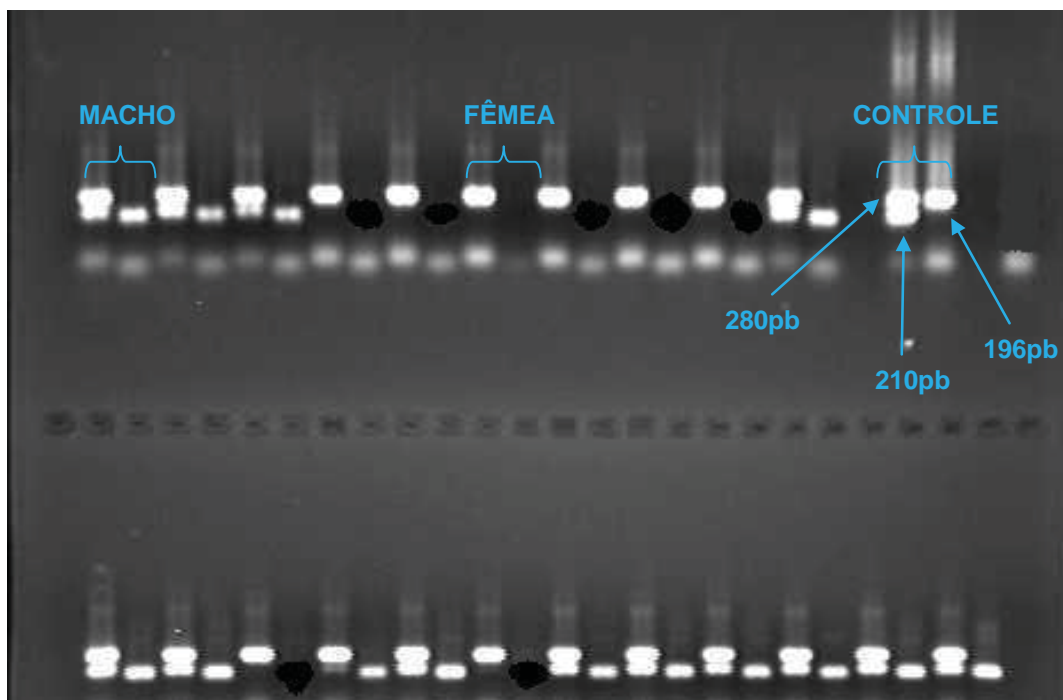


FIGURA 8. Visualização do gel de agarose após eletroforese demonstrando as bandas que determinam o sexo dos embriões.

5.1.5. Forma de análise dos resultados

A análise estatística foi feita pelo teste do Qui-quadrado (com nível de significância de 5%) para a acuidade da sexagem de espermatozóides levando-se em consideração o desvio da proporção sexual do grupo controle.

5.2. EXPERIMENTO 2

O experimento 2, assim como o grupo VI, é a junção dos dois grupos experimentais que tiveram a maior taxa de produção embrionária (Maturação 18 horas – grupo II e Gradiente de sexagem – grupo IV). Porém os embriões produzidos nesse experimento foram feitos através de oócitos provenientes de aspirações *in vivo* e posteriormente transferidos para se obter a taxa de prenhez aos 30 dias e a porcentagem de fêmeas e machos aos 45 dias de gestação através de sexagem fetal por ultrassom.

Aspiração folicular *in vivo* (OPU) para a obtenção dos oócitos

Foram feitas três sessões de aspiração folicular guiada por ultrassom (FIGURA 10) em fazendas localizadas nos municípios de Frutal e Sacramento no estado de Minas Gerais e em Monte Alto, São Paulo. Essas aspirações foram realizadas com intervalo de aproximadamente 10 dias de uma para outra. Não houve indução hormonal nos animais aspirados.

Em Frutal foram aspiradas quatro vacas, em Sacramento seis e em Monte Alto oito (FIGURA 09). Os oócitos foram selecionados em laboratórios montados nas fazendas e a seleção foi feita como no grupo controle.



FIGURA 9. Doadoras utilizadas nas aspirações. Fazenda São Sebastião, Sacramento, Minas Gerais.



FIGURA 10. Aparelho de ultrassom utilizado nas aspirações. Fazenda São Sebastião, Sacramento, Minas Gerais.

Os oócitos selecionados foram transportados para o laboratório de cultivo celular da Unesp Jaboticabal em criotubos contendo 500 μ l de meio de maturação coberto com 300 μ l de óleo mineral. Os criotubos foram devidamente identificados com os nomes ou números das doadoras e transportados para o laboratório em transportadora de oócitos a 38°C.

Ao chegar no laboratório os oócitos foram transferidos para placas de maturação previamente preparadas e maturados por 18 horas em estufa de CO₂ a 38,5°C até o momento da FIV no dia seguinte.

PIVE e transferência de embriões

Para as FIVs foi utilizado o sêmen de quatro touros sendo dois da raça Holandesa, um Girolando e um da raça Gir que foram escolhidos pelos proprietários. A FIV foi feita como no grupo IV (gradiente de sexagem) e o cultivo como no grupo controle.

No oitavo dia após a FIV os embriões considerados grau I foram envasados em palhetas de 0,25 mL em meio HSO_F e transferidos em vacas receptoras previamente sincronizadas nos mesmos locais das aspirações.

Diagnóstico de gestação e sexagem fetal

O diagnóstico de gestação foi feito através de palpação retal 45 dias após as transferências e a sexagem fetal feita por ultrassom 15 dias após confirmação das prenhez (FIGURAS 11 e 12).

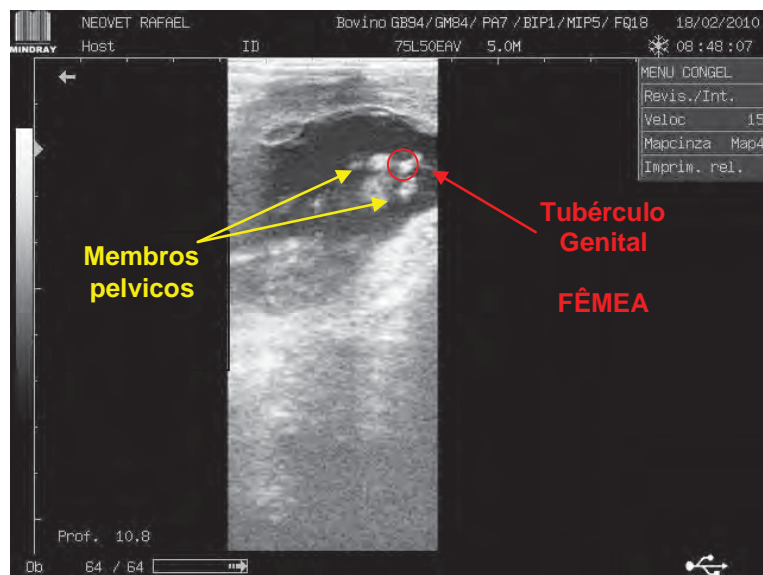


FIGURA 11. Imagem de sexagem fetal por ultrassom de uma fêmea. Imagem de arquivo de Rafael Erli cedida gentilmente.

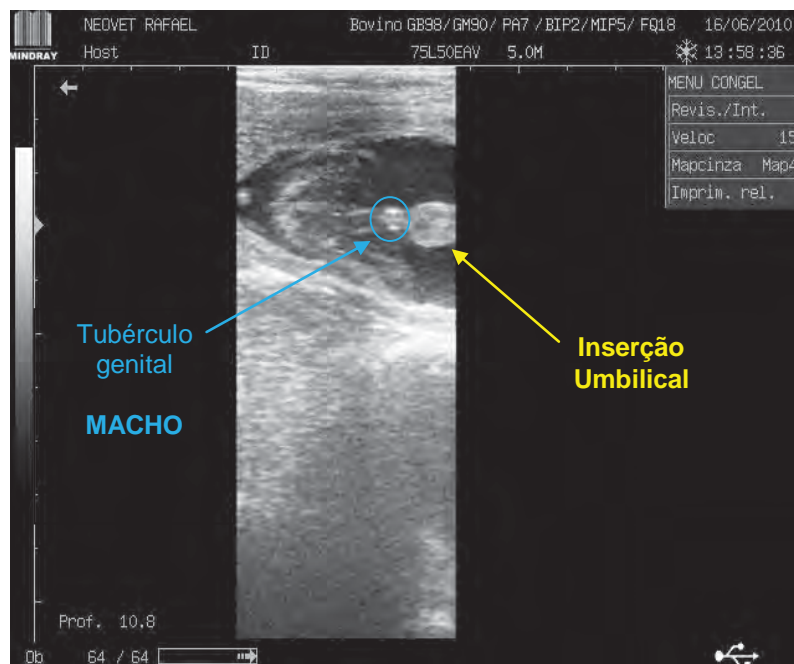


FIGURA 12. Imagem de sexagem fetal por ultrassom de um macho. Imagem de arquivo de Rafael Erli cedida gentilmente.

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.EXPERIMENTO 1.

Foram feitas 5 repetições por grupo, no mínimo dois grupos feitos simultaneamente, com exceção do grupo V para o qual foram feitas apenas 2 repetições. Em cada repetição de cada grupo (com exceção dos grupos III e V), antes da FIV, o sêmen foi avaliado quanto à concentração, à motilidade e ao vigor sendo que este se mostrou satisfatório em relação a esses três parâmetros de avaliação, como demonstra a tabela 2.

TABELA 2. Média da avaliação dos parâmetros concentração, motilidade e vigor do sêmen em 5 repetições, dos touros da raça Girolando e Gir, dos grupo I (Controle), II (Maturação 18 horas) e IV (Gradiente de sexagem).

GRUPO	TOURO	CONCENTRAÇÃO	MOTILIDADE	VIGOR
GRUPO I	GIROLANDO	30×10^6	85%	5
	GIR	30×10^6	90%	5
GRUPO II	GIROLANDO	30×10^6	90%	5
	GIR	30×10^6	90%	5
GRUPO IV	GIROLANDO	30×10^6	95%	5
	GIR	30×10^6	85%	5

A média da concentração de 30×10^6 espermatozoides, a motilidade e o vigor foi semelhante em todas as repetições porque as palhetas de sêmen utilizadas eram da mesma partida e foram comprados de uma mesma central. Não houve diferença entre os touros em relação aos parâmetros de avaliação utilizados.

No grupo IV, a taxa de recuperação dos espermatozoides após a centrifugação no gradiente de densidade foi em média 5 milhões de espermatozoides (16,66%). De acordo com Van Munster et al. (1999) esta taxa de recuperação é um forte indício que, em média, os gradientes testados foram eficientes para separar os espermatozoides

portadores do cromossomo X daqueles portadores do Y. Os autores demonstraram que métodos de sexagem de espermatozóides em que as taxas de recuperação estivessem entre 10 e 20%, permitem atingir acuidade de sexagem de até 70%.

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados da avaliação do sêmen dos grupos III e V respectivamente.

TABELA 3. Avaliação do sêmen antes da FIV, das duas repetições feitas, do grupo III (Incubação) quanto aos parâmetros de concentração, motilidade e vigor, antes e depois da incubação em estufa de CO₂ por 12 horas.

REPETIÇÃO	PARÂMETRO DE AVALIAÇÃO	ANTES DA INCUBAÇÃO		DEPOIS DA INCUBAÇÃO
		ANTES DA LAVAGEM	DEPOIS DA LAVAGEM	
1 GIROLANDO	CONCENTRAÇÃO	40 X 10 ⁶	35 X 10 ⁶	3 X 10 ⁶
	MOTILIDADE	80%	90%	10%
	VIGOR	5	5	3
2 GIR	CONCENTRAÇÃO	40 X 10 ⁶	37 X 10 ⁶	3 X 10 ⁶
	MOTILIDADE	85%	90%	10%
	VIGOR	5	5	2

De acordo com o resultado demonstrado na tabela 3 verifica-se que houve uma diminuição muito significativa da concentração e da motilidade após as 12 horas de incubação, de 90% para 10%. LECHNIAK et al (2003) testaram a incubação do sêmen, em meio FIV sem heparina, por 6 e 24 horas em comparação com sêmen sem incubação para posterior fecundação *in vitro*. Eles descreveram que a motilidade dos espermatozóides diminuiu significativamente de acordo com o aumento do tempo de incubação, 80% no grupo controle, 65% no grupo em que a incubação foi feita por 6 horas e 45% no grupo em que o sêmen foi incubado por 24 horas, porém após as primeiras 15 horas desse último grupo o meio foi trocado por um meio fresco, esse pode ser o motivo pelo qual a motilidade não foi tão baixa quanto a que encontramos. A motilidade espermática é uma das principais características associadas com a capacidade de fecundação do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002).

TABELA 4. Avaliação do sêmen antes da FIV, das duas repetições, do grupo V (Múltiplos tratamentos) quanto aos parâmetros de concentração, motilidade e vigor, antes e depois da incubação por 12 horas e depois da centrifugação em gradiente de sexagem.

REPETIÇÃO	PARÂMETRO DE AVALIAÇÃO	ANTES DA INCUBAÇÃO		DEPOIS DA INCUBAÇÃO	DEPOIS DO GRADIENTE
		ANTES DA LAVAGEM	DEPOIS DA LAVAGEM		
1 GIROLANDO	CONCENTRAÇÃO	40 X 10 ⁶	35 X 10 ⁶	3 X 10 ⁶	Poucos, não se conseguiu contar a concentração.
	MOTILIDADE	80%	90%	10%	5%
	VIGOR	5	5	3	3
2 GIR	CONCENTRAÇÃO	40 X 10 ⁶	37 X 10 ⁶	3 X 10 ⁶	Poucos, não se conseguiu contar a concentração.
	MOTILIDADE	85%	90%	10%	5%
	VIGOR	5	5	2	2

Essa tabela 4 demonstra que a motilidade dos espermatozoides é reduzida ainda mais depois de uma centrifugação em um gradiente de Percoll de 9 mL, após ter sido incubado por 12 horas pois caiu de 10 para 5%, sugerindo que os espermatozoides já estão em processo de capacitação após a incubação, o que pode ser confirmado também pela diminuição do vigor que caiu de 5 para 3. E essa drástica redução da concentração após a centrifugação ocorreu porque o gradiente seleciona os espermatozoides viáveis e já houve uma grande diminuição após a incubação.

6.1.1. Produção *in vitro* de embriões

Os resultados das produções de embriões como número de oócitos utilizados, total de estruturas para cultivo, clivagem e total de embriões produzidos de todos os grupos se encontram nas tabela 5

TABELA 5. Total de oócitos, números de estruturas cultivadas, porcentagem de embriões clivados e total de embriões produzidos em seis tratamentos para produção *in vitro* de embriões bovinos.

GRUPO	NÚMERO DE OÓCITOS	NUMEROS DE ESTRUTURAS CULTIVADAS	CLIVAGEM N (%) ¹	BLASTOCISTOS N (%) ²
CONTROLE (I)	1875	1725	1411 ^a (75,25%)	526 ^a (28,05%)
MATURAÇÃO (II)	1835	1728	1391 ^a (75,80%)	656 ^b (35,74%)
INCUBAÇÃO (III)	1942	1802	1025 ^b (52,78%)	282 ^c (14,52%)
GRADIENTE DE SEXAGEM (IV)	2305	2091	1696 ^a (73,57%)	568 ^a (24,64%)
MÚLTIPLOS TRATAMENTOS (V)*	1033	900	533 ^b (51,59)	115 ^d (11,13%)
MATURAÇÃO ASSOCIADA AO GRADIENTE DE SEXAGEM (VI)	580	502	439 ^a (75,68%)	121 ^c (20,86%)

A, B Letras diferentes entre linhas na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste do qui-quadrado ao nível de significância de 5%

1-Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2-Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

*-Múltiplos tratamentos: associação da incubação espermática e da maturação por 18 horas ao gradiente de sexagem.

Nos grupos I, II, IV e VI os resultados das taxas de clivagem foram semelhantes (75,25%, 75,80%, 73,57% e 75,68% respectivamente), e diferenciaram estatisticamente dos grupos III e V (52,78% e 51,59% respectivamente) que obtiveram uma taxa de clivagem bem menor. Essa queda da clivagem pode ser explicada pela perda da habilidade dos espermatozóides em fecundar, como será discutido mais adiante.

Em relação a taxa de produção de embriões o grupo que se destacou com a maior produção foi o grupo II com 35,74% de embriões produzidos e foi diferente estatisticamente de todos os outros, o que demonstrou que essa redução na maturação não afetou a fecundação. Já a produção embrionária do grupo IV (24,64%) não teve diferença estatística do grupo I (28,05%), demonstrando que o gradiente não diminui a produção de embriões.

A taxa dos grupos III (14,52%) e V (11,13%) foi significativamente menor em relação aos grupos já citados, o que sugere mais uma vez que os espermatozoides foram afetados pela incubação e no que se refere a este último grupo, a centrifugação afetou ainda mais por ter sido feita após a incubação.

O grupo VI foi estatisticamente diferente dos outros em relação a produção embrionária (20,86%), porém semelhante ao grupo III, esse resultado pode ser explicado pelo número menor de repetições que foi feito nele.

Essas taxas de produção de embriões, mesmo as dos grupos em que foram melhores (TABELA 5), são mais baixas quando comparadas com taxas de produção em que o cultivo é feito na presença de SFB, pois o soro promove o desenvolvimento embrionário. RAGAGNIN DE LIMA (2011) testou diferentes fontes protéicas no meio de cultivo de embriões bovinos e encontrou a menor taxa de produção quando os embriões foram cultivados apenas com BSA (31,88%) e a maior taxa quando foram cultivados em meio com BSA e SFB (44,83%). No presente experimento o cultivo embrionário de todos os grupos foi feito sem o SFB, apenas com BSA.

A tabela 6 mostra o número total de embriões sexados pela técnica da PCR de todos os grupos, bem como a comparação da porcentagem de machos e fêmeas entre eles.

TABELA 6. Porcentagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*, machos e fêmeas, dos seis tratamentos realizados.

GRUPOS	MACHOS (%)	FÊMEAS (%)	TOTAL
I-CONTROLE	59 (56,73) ^a	45 (43,27) ^a	104
II-MATURAÇÃO 18HS	54 (55,67) ^a	43 (44,33) ^a	97
III-INCUBAÇÃO	41 (40,59) ^b	60 (59,41) ^b	101
IV-GRADIENTE	36 (35,64) ^b	65 (64,36) ^b	101
V-MÚLTIPLOS TRATAMENTOS*	30 (31,91) ^b	64 (68,09) ^b	94
VI-GRADIENTE E MATURAÇÃO	34 (48,57) ^a	36 (51,43) ^a	70

a, b Letras minúsculas diferentes entre linhas na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste do qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

*-Múltiplos tratamentos: associação da incubação espermática e da maturação por 18 horas ao gradiente de sexagem.

A tabela 6 nos mostra que houve estatisticamente um desvio no sexo, em favor das fêmeas, dos embriões produzidos nos grupos III, IV e V (59,41%, 64,36% e 68,09%) em relação ao grupo controle, porém os grupos II e VI não demonstraram esse desvio. Ficou demonstrado que a incubação dos espermatozoides desvia o sexo em relação as fêmeas, porém reduz a produção embrionária, sugerindo que realmente o estresse oxidativo e a produção de radicais livres afeta a capacidade de fecundação dos espermatozoides (VISHWANATH e SHANNON, 1999) e parece afetar mais os Y que os X (LECHNIAK et al., 2003).

Porém a maturação dos oócitos por 18 horas e a incubação dos espermatozoides por 12 horas associadas a centrifugação do sêmen em gradiente de densidade não aumentaram a acuidade da sexagem acima de 65%, como foi proposto na hipótese deste trabalho, visto que não houve diferença significativa entre o grupo III e o V e o II não desviou o sexo.

Esse resultado do grupo I de 56,73% de machos, é um pequeno aumento no número de embriões do sexo masculino (TABELA 6) e já era esperado, pois o sistema de cultivo da PIVE, sem nenhuma técnica utilizada para diminuir essa proporção, desvia o sexo dos embriões em favor dos machos.

A tabela 6 nos mostra que a taxa de clivagem obtida no grupo II foi de 75,80%. RIZOS et al., (2008) diminuíram o tempo de maturação de oócitos bovinos na PIVE, de 24 para 16 horas e encontraram uma diminuição significativa da clivagem dos embriões após 48 horas da fecundação (77,1% e 70,6%, 24 e 16 horas respectivamente). Esses resultados não estão de acordo com os encontrados no presente trabalho, em que não houve diferença significativa na clivagem dos embriões no grupo com 18 horas de maturação em relação ao controle (TABELA 5). Entretanto, em relação a diferença na proporção sexual com a diminuição do tempo de maturação, os autores também não encontraram diferença entre os embriões produzidos. Eles obtiveram um total de 41,5% de fêmeas no grupo com 16 horas de maturação e neste trabalho foi encontrado 44,33% de fêmeas no grupo 18 horas de maturação.

Tanto DOMINKO e FIRST (1997) e GUTIERREZ-ÁDAN et al. (1999) relataram que a fecundação do oócito imediatamente após a extrusão do primeiro corpúsculo polar (aproximadamente 16 horas após o início da maturação), resultou em mais embriões do sexo feminino, porém o atraso da fecundação em 8 horas resulta em mais embriões do sexo masculino. Eles sugerem que essa diferença observada da proporção sexual, diferente de 1:1, que é o esperado, é influenciada pelo estágio de maturação do oócito e a cinética de interação espermatozóide-oócito. Eles propõem que o atraso na fecundação permite que os oócitos, que chegam a metáfase II, processem mais efetivamente o espermatozóide Y e que o atraso na fecundação permite que um número maior de oócitos alcancem um estágio ótimo de maturação (RIZOS et al., 2008).

Neste estudo não foram selecionados oócitos com presença, ou não, do primeiro corpúsculo polar, mesmo porque o tempo de maturação foi de 18 horas. AGUNG et al., (2006), igualmente a este trabalho, não selecionaram oócitos baseados na extrusão do

primeiro corpúsculo polar e também não observaram diferença na proporção sexual de embriões com 16 horas de maturação comparados com 22.

Foi sugerido que a vida fértil dos espermatozoides, *in vitro*, é de aproximadamente de 3 a 5 dias quando estocados em temperaturas que variam de 10 a 21°C, entretanto a fertilidade diminui em temperaturas acima de 25°C (VISHWANATH e SHANNON, 1999). Tem sido demonstrado também que a longevidade espermática é prolongada para aproximadamente 30 horas quando se cultiva os espermatozoides com células epiteliais do oviduto *in vitro* a 39°C, essa informação sugere que essas células também sejam capazes de manter a viabilidade espermática (POLLARD et al., 1991).

A porcentagem de embriões produzida no grupo III, 14,52% como nos mostra a Tabela 5, é bem mais baixa em comparação ao grupo controle, o que sugere que os espermatozoides perderam a capacidade de fecundação depois da incubação, como foi mostrado anteriormente pelo resultado da perda da motilidade após a incubação (TABELA 3). A incubação do sêmen por 12 horas também não foi feita na presença de células do oviduto, o que reduziu bastante a capacidade de fecundação dos espermatozoides quando comparado com o grupo controle. Essa perda da habilidade de fecundação tem sido atribuída também, e principalmente, ao estresse oxidativo e a produção de radicais livres que afetam o potencial de sobrevivência dos espermatozoides (VISHWANATH e SHANNON, 1999).

WATKINS et al. (1996), revelaram que os espermatozoides que contêm o cromossomo X, após incubação de 24 horas, demonstraram maior motilidade, progressão e hiperativação quando comparados com o espermatozoides que contêm o Y. Nesse estudo demonstramos que a incubação realmente parece ter afetado negativamente os espermatozoides Y, já que obtivemos um número maior de embriões do sexo feminino (59% de fêmeas e 41% de machos aproximadamente). A incubação selecionou os espermatozoides em favor das fêmeas, porém diminuiu a capacidade de fecundação o que levou a produção de um número muito baixo de embriões.

A sexagem de espermatozoides por centrifugação em gradiente de densidade resultou em 73% de taxas de clivagem 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% com acuidade de sexagem de até 70%. LUCIO et al. (2012), utilizando o mesmo método de sexagem, também observou taxas de clivagem de 70% e de blastocisto de 27,6% corroborando com o resultado que obtivemos tanto na taxa de clivagem, 73%, quanto na de produção embrionária, 24,64%. 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% e taxa de blastocisto de 23%, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Apesar de não significativo, a centrifugação em gradiente de densidade apresentou taxas de clivagem e blastocistos menores que o grupo controle, 75,25% e 28,05%, respectivamente. 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; PERINI, 2007; RESENDE et al., 2010a; LUCIO et al., 2012), comprovando que esta metodologia possui repetibilidade para o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

Existem na literatura resultados descritos deste mesmo gradiente de sexagem, com sêmen convencional congelado/descongelado em relação ao desvio da proporção sexual em favor das fêmeas com resultados semelhantes ao que conseguimos neste trabalho (64% de fêmeas), Resende et al. (2009) utilizando a mesma técnica conseguiu um desvio de 63%; Lucio et al. (2012) demonstrou 60% e Perini (2007) 62% de desvio. Outros resultados satisfatórios em relação a esse desvio, com o mesmo gradiente, porém com sêmen *in natura* também já foram demonstrados com resultados de até 74.3% de acuidade na sexagem (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2011) em favor das fêmeas. Esses resultados demonstram mais uma vez a eficiência do gradiente de sexagem em separar os espermatozóides X dos Y e sua repetibilidade.

Os espermatozóides utilizados no presente estudo passaram por processo de descongelamento e, após isto, foram submetidos à centrifugação nos gradiente de densidade. Os processos de congelamento/descongelamento aumentam a proporção de

espermatozóides capacitados que sofreram reação acrossomal (BARABAS e 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, 2012; OLIVEIRA, 2012; 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, 2011), selecionando os espermatozóides que não foram danificados pelo processo de congelação/descongelação. A integridade da membrana plasmática é fundamental na capacidade de fecundação do espermatozóide (FLESH e GADELLA, 2000).

As taxas de clivagem (51,59%) e produção embrionária (11,13%) do grupo V, são bem menores em relação ao controle (75,25% e 28,05% respectivamente) e estatisticamente semelhante ao grupo incubação espermática no que se refere a clivagem (52,78%) como demonstradas na tabela 5. De todos os grupos esse teve a menor taxa de produção embrionária, o que, na verdade, após a análise dos outros grupos, já era esperado, pois além da incubação por 12 horas, o que diminuiu significativamente a motilidade espermática, o sêmen foi centrifugado em gradiente de sexagem, diminuindo ainda mais a motilidade e a concentração.

E como já foi discutido anteriormente que a centrifugação do sêmen em gradiente de densidade, selecionou espermatozóides sem fragmentação no DNA (RESENDE et al., 2010b), reduziu a proporção de espermatozóides com defeitos maiores e aumentou o percentual de células com membrana plasmática íntegra (OLIVEIRA et al., 2011), pode ser que o processo de incubação cause danos a membrana ou induza reação acrossomal, por isso ocorre essa diminuição na concentração e conseqüentemente menor taxa de produção embrionária. Porém neste trabalho não foram analisados danos aos espermatozóides após incubação.

E no que diz respeito ao desvio da proporção sexual, houve uma seleção dos espermatozóides ligeiramente maior que no grupo sexagem demonstrada pela taxa de embriões fêmeas produzida (68,09%), apesar de não ter sido estatisticamente diferente (TABELA 6).

Não houve diferença significativa entre a clivagem dos embriões do grupo VI em relação ao controle (75,68% e 75,25% respectivamente), porém a taxa de produção embrionária foi significativamente menor (20,86% e 28,05% respectivamente) como demonstrada na tabela 5. Nesse grupo, apesar de ter um número maior de embriões fêmeas sexados pela PCR (TABELA 6), não houve diferença estatística em relação ao controle. Esse fato pode ser explicado pelo baixo número de embriões sexados em relação aos outros grupos, pois quando foi feita a extração do DNA para a realização da PCR, não foi possível extrair de todos os embriões produzidos nesse grupo.

TABELA 7. Porcentagem de machos e fêmeas por estadio de desenvolvimento em embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes tratamentos.

GRUPOS	BI		BL		BX	
	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)
CONTROLE (I)	24 (68,57) ^a	11 (31,43) ^a	17 (50,00) ^a	17 (50,00) ^a	18 (51,43) ^a	17 (48,57) ^a
MATURAÇÃO 18HS (II)	18 (58,00) ^a	13 (42,00) ^a	19 (57,58) ^a	14 (42,42) ^a	17 (51,52) ^a	16 (48,48) ^a
INCUBAÇÃO ESPERMATICA (III)	14 (33,34) ^b	28 (66,66) ^b	13 (46,42) ^a	15 (53,57) ^a	14 (45,16) ^a	17 (54,83) ^a
GRADIENTE (IV)	10 (30,30) ^b	23 (69,70) ^b	13 (37,15) ^a	22 (62,85) ^a	13 (39,40) ^a	20 (60,60) ^a
MÚLTIPLOS TRATAMENTOS (V)*	4 (25,00) ^b	8 (75,00) ^b	10 (37,03) ^a	17 (62,97) ^a	16 (29,09) ^b	39 (70,90) ^b
GRADIENTE E MATURAÇÃO (VI)	8 (47,00) ^a	9 (53,00) ^a	12 (48,00) ^a	13 (52,00) ^a	14 (50,00) ^a	14 (50,00) ^a

Letras diferentes entre linhas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste do qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

*-Múltiplos tratamentos: associação da incubação espermática e da maturação por 18 horas ao gradiente de sexagem.

A tabela 7 nos mostra que em relação a porcentagem de machos e fêmeas por estadio embrionário entre os grupos, só houve diferença significativa entre os Blastocistos Iniciais (BI) dos grupos III, IV e V em relação ao controle. Entre os Blastocistos (BL) não houve diferença e entre os Blastocistos Expandidos (BX) apenas no grupo V em relação ao controle.

Vários estudos demonstram que embriões do sexo masculino se desenvolvem mais rapidamente que os do sexo feminino (XU et al. 1991; KOCHHAR et al. 2001) e a seleção desses embriões mais desenvolvidos pressupondo que eles possuem melhor capacidade de gerar uma prenhez pode ser uma das razões da predominância de machos entre os bezerros nascidos de FIV (HASLER 2000). Nossos resultados não estão de acordo com o que afirmam os autores citados acima, pois não tivemos um

numero maior de machos entre os BX, que dentre os três, é o estágio embrionário mais desenvolvido.

6.2.EXPERIMENTO 2

TABELA 8. Vacas aspiradas, total de oócitos viáveis, estruturas para o cultivo, porcentagem de embriões produzidos *in vitro* com oócitos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom em Frutal, Sacramento e Monte Alto.

LOCAL DA ASPIRAÇÃO	TOTAL DE VACAS ASPIRADAS	TOTAL DE OÓCITOS VIÁVEIS	TOTAL DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	TOTAL DE EMBRIÕES PRODUZIDOS ¹ (%)
Frutal	4	126	124	37 (29,36%)
Sacramento	6	150	144	44 (29,33%)
Monte Alto	8	54	52	7 (12,96%)
Total	18	330	320	88 (26,66%)

1- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Os embriões produzidos por essas aspirações foram feitos como no grupo VI do experimento 1. Os resultados das taxas de produções embrionárias (TABELA 8) das aspirações feitas em Frutal e Sacramento (29,36% e 29,33% respectivamente) foram muito semelhantes, porém a de Monte Alto (12,96%) foi bem mais baixa, o que pode ser explicado pela qualidade dos oócitos que foram aspirados, pois não eram de boa qualidade, talvez porque as doadoras aspiradas eram vacas de alta produção leiteira. Mas, mesmo assim, a FIV dessa aspiração foi feita, pois já havia receptoras sincronizadas para transferência dos embriões produzidos.

Apenas os embriões de boa qualidade, grau I, foram envasados e transferidos, os outros foram descartados. O diagnóstico de prenhez, feito aos 45 dias de gestação, e o resultado da sexagem fetal, feita 15 dias após a confirmação das prenhez, estão na tabela 9.

TABELA 9. Porcentagem de prenhez após a transferência de embriões produzidos *in vitro* das três aspirações, bem como a porcentagem de embriões fêmeas e machos diagnosticada pela sexagem fetal aos 60 dias de gestação.

LOCAL	TRANSFERÊNCIAS	PRENHEZES (%)	FÊMEAS (%)	MACHOS (%)
Frutal	29	13	11	2
Sacramento	13	4	4	-
Monte Alto	7	1	1	-
TOTAL	49	18 (36,73)	16 (88,88)	2 (11,12)

Foram transferidos, no total, 49 embriões. Das 49 transferências, 18 resultaram em prenhez e dessas prenhez, 16 fetos foram diagnosticados fêmeas.

A taxa média de prenhez após a transferência das 3 aspirações e produção *in vitro* de embriões utilizando maturação dos oócitos por 18 horas e centrifugação do sêmen em gradiente de densidade foi de 36,73%. Esse resultado de prenhez é um bom resultado e é semelhante aos encontrados por STEWART et al., (2011) e PONTES et al., (2010) que produziram embriões utilizando sêmen sexado por citômetro de fluxo e por PONTES et al., (2009) utilizando sêmen convencional.

A porcentagem de fêmeas foi de 88,88% o que demonstra ser um ótimo resultado e demonstra também que o gradiente de sexagem atingiu uma acuidade maior que 65%.

7.CONCLUSÕES

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

- 1) O método de seleção do sexo em gradiente de densidade não altera o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e selecionou 64% dos espermatozóides em favor das fêmeas;
- 2) A técnica de incubação de espermatozóides antes da FIV pode ser considerada um outro método de seleção dos espermatozóides, porém diminui muito a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos;
- 3) A associação da incubação dos espermatozóides por 12 horas e da redução da maturação de 24 para 18 horas ao gradiente de densidade não aumenta sua taxa de acuidade e prejudica a produção embrionária em embriões no D8;
- 4) A taxa de prenhez de 36,73% e a porcentagem de fêmeas de 88,88% são resultados muito satisfatórios e demonstram que o uso da técnica de gradiente de sexagem associado a maturação por 18 horas, para produção *in vitro* de embriões bovinos, é uma alternativa ao uso do sêmen sexado pelo citômetro de fluxo, já que não prejudica a produção embrionária.

8.REFERÊNCIAS

ABE H, YAMASHITA S, ITOH T, SATOH T, HOSHI H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and –fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.325–335, 1999.

AGUNG, B.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, R.; WATARI, H.; NAGAI, T. Effect of maturation culture period of oocyte on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, 2006.

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.

ALVES, B. C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; TEIXEIRA, C. M.; MOREIRA-FILHO, C. A. Use of primers derived from a new sequence on the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**. v. 59, n. 5-6, p.1415-1419, 2003.

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

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

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

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, 2010a.

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

BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; den DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p.1647-1655, 2005.

BONDIOLI, K. R.; ELLIS, S. B.; PRYOR, J. H.; WILLIAMS, M. W; HARPOLD, M. M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.31, p.95-104, 1989.

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

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

CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; MARTINS, C.E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A.C.C.; LIMA, V.M.B. Sistema de produção de leite (Cerrados). Embrapa Gado de Leite. Sistema de Produção 2. <http://www.bovino.com.br/emb/sp/cerrados/racas01.php>. 2009.

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.

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.

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 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. **J. Dairy Sci** .91:847–56, 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.

DOMINKO T, FIRST NL. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. **Theriogenology**, v.47, p.1041–1050, 1997.

ELLIS, S.B.; HARPOLD, M.M. Nucleic acid probes for prenatal sexing. International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) **World Intellectual Property Organization. Publication**, nº. WO 86/07095, 1986.

ELLIS, S.B.; BONDIOLI, K.R.; WILLIAMS, M.E.; PRYOR, J.H.; HARPOLD, M.M. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**. v.29, p.242, 1988

FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; PÉREZ-CRESPO, M.; SÁNCHEZMARTÍN, 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.

FRYDMAN, N.; PRISANT, N.; HESTERS, L.; FRYDMAN, R.; TACHDJAN, G.; COHEN-BACRIE, P.; FANCHIN. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. **Fertility and Sterility**, v.89, n.2, p.92-7, 2008.

GABLER, C.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrus cycle. **Reproduction**, v.126, n.6, p.721-729, 2003.

GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and Ychromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, v.71, p.11-21, 2009.

GARNER, D.L.; SEIDEL Jr., G.E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, n.69, p.886-85, 2008.

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.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PEREZ, G., GRANADOS, J., GARDE, J. J., PEREZ-GUZMAN, M., PINTADO, B., AND DE LA FUENTE, J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Zygote**, v.7, p.37–43, 1999.

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.

HASLER JF. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. **Human Reproduction**, v.15 (Suppl 5), p.47–58, 2000.

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.

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).

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., 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. **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.

IWASAKI, S., SHIOYA, Y.; MASUDA, H.; HANADA, A.; NAKAHARA, T. Sex ratio of early embryos fertilized *in vitro* with spermatozoa separated by Percoll. **Theriogenology**, Stoneham, v.30, n.6, p.1191-8, 1988.

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.; 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, L.A.; CRAN, D.G.; POLGE, C. Recent advances in sex preselection of cattle: flow cytometric sorting of X- Y- chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. **Theriogenology**. v.41, n.1, p.51-56, 1994.

KIMURA, K.; IWATA, H.; THOMPSON, G. J. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. **Animal Reproduction Science**. v.103, p.228–238, 2008.

KIMURA, K.; SPATE, L. D.; GREEN, M. P.; ROBERTS, R. M. Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-tau by bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, n.1, p.88-95, 2004.

KOCHHAR HPS, PEIPPO J, KING WA. Sex related embryo development. **Theriogenology**. v.55, p.3–14, 2001.

LARSON AM, KIMURA K, KUBISCH HM, ROBERTS RM. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-s. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.98, p.9677–9682, 2001.

LECHNIAK, D.; STRABEL, T.; BOUSQUET, D.; KING, A.W. Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.224-227, 2003.

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.

LUCIO, A. C. Expressão gênica diferencial em embriões bovinos produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por gradiente de densidade ou por citometria de fluxo. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V.; DERNOWSEK, J.A.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; MIGUEL, M.C.V.; CARMO, A.S.; TOMITA, S.Y; ALVES, B.C.A.; FAZANO, F.A.T.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Assessment of Modified Swim-up and Discontinuous Density 1 Gradient in Sperm Sex Preselection for Bovine Embryo Production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (aceito para publicação) 2012.

LUZ, M. R.; WATANABE, Y. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I.; MAURO, S. M. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; FRANCESCHINI, P. H. Sexing o *in vitro* fertilized bovine embryos by multiplex PCR. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, p.453-456, 2000.

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.

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.

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, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER J.M.; JOHNSON, S. WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316–1325, 2007.

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

flowcytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.931-40, 2007.

OLIVEIRA, L. Z.; Arruda, R. P.; Celeghini, E. C. C.; Andrade A. F. C.; Perini, A. P.; Resende, M. V.; Miguel, M. C. V.; Lucio, A. C.; Hossepian de Lima, V. F. M. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrology**, v.44, p.9-15, 2011.

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.

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.

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, p.56. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

POLLARD JW, PLANTE C, KING WA, HANSEN PJ, BETTERIDGE KJ, SUAREZ SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. **Biology of Reproduction**, v.44, p.102–107, 1991.

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo

production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349–1355, 2010.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690–697, 2009.

RAGAGNIN DE LIMA, M. Estudo comparativo entre fontes de macromoléculas na produção in vitro de embriões bovinos e seus reflexos na criopreservação. 2011. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 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, 2009.

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 espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, p 260-269, 2010b.

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.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, 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.

RORIE, R.W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenology**. V. 52, p. 1273-1280, 1999.

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.

SILVERMAN, A.Y.; STEPHENS, S.R.; DROUIN, M.T.; ZACK, R.G.; OSBORNE, J.; ERICSSON, S.A. Female sex selection using clomiphene citrate and albumin separation of human sperm. **Human Reproduction**, v.17, n.5, p.1254-56, 2002.

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.

STEWART, B.M.; BLOCK, J., MORELLI, P.; NAVARETTE, A.E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J.; BILBY, T.R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 3437-3445, 2011.

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, refrozen-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 MUNSTER, E.B., STAP, J., HOEBE, R.A., TE MEERMAN, G.J., ATEN, AT. Difference in volume of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. **Cytometry**, v.35, p.125-8, 1999.

VAN SOOM, A; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1453-1465, 2002.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, 149–179, 2002.

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.

VISHWANATH R, SHANNON P. Do sperm cell age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.321–331, 1999.

WATKINS AM, CHAN PJ, PATTON WC, JACOBSON JD, KING A. Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. **Andrology**, v37, p.1–5, 1996.

WEIGEL, K.A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.87 (E. Suppl.): E120-E130, 2004.

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.

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. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.2510-18, 2006.

XU KP, YADAV BR, KING WA, BETTERIDGE KJ. Sex related differences in developmental rates of bovine embryos produced in vitro. *Molecular, Reproduction and Development*, v.31, p.249–252, 1991.

ANEXOS

Anexo 1

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões produzidos produzidos *in vitro* do grupo Controle.

REPETIÇÃO	Nº DE OOCITOS UTILIZADOS	Nº DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	Nº DE EMBRIÕES CLIVADOS	Nº DE EMBRIÕES PRODUZIDOS
1	250	170	139	52
2	375	360	318	190
3	500	478	381	69
4	375	350	280	105
5	375	367	293	110
TOTAL	1875	1725	1411 (75,25%)¹	526 (28,05%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Anexo 2

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões bovinos produzidos *in vitro* no grupo em que houve a diminuição da maturação de 24 para 18 horas.

REPETIÇÃO	Nº DE OOCITOS UTILIZADOS	Nº DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	Nº DE EMBRIÕES CLIVADOS	Nº DE EMBRIÕES PRODUZIDOS
1	625	604	473	280
2	250	230	185	95
3	250	238	201	107
4	360	336	272	99
5	350	320	260	75
TOTAL	1835	1728	1391 (75,80%)¹	656 (35,74%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Anexo 3

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões bovinos produzidos *in vitro*, no grupo em que o sêmen foi submetido a incubação por 12 horas

REPETIÇÃO	N° DE OOCITOS UTILIZADOS	N° DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	N ° DE EMBRIÕES CLIVADOS	N° DE EMBRIÕES PRODUZIDOS
1	250	240	151	48
2	534	517	389	94
3	350	310	130	35
4	383	352	159	48
5	425	383	196	57
TOTAL	1942	1802	1025 (52,78%)¹	282 (14,52%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Anexo 4

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões bovinos produzidos *in vitro* do grupo em que o sêmen foi centrifugado em gradiente de sexagem.

REPETIÇÃO	N° DE OOCITOS UTILIZADOS	N° DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	N ° DE EMBRIÕES CLIVADOS (%)	N° DE EMBRIÕES PRODUZIDOS (%)
1	400	355	280	122
2	370	345	278	88
3	750	668	552	122
4	380	358	290	98
5	405	365	296	138
TOTAL	2305	2091	1696 (73,57%)¹	568 (24,64%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Anexo 5

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões bovinos produzidos *in vitro* do grupo em que se aliam ao gradiente de sexagem, a maturação dos oócitos reduzida para 18 horas e a incubação do sêmen por 12 horas antes da fecundação.

REPETIÇÃO	Nº DE OOCITOS UTILIZADOS	Nº DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	Nº DE EMBRIÕES CLIVADOS	Nº DE EMBRIÕES PRODUZIDOS
1	543	447	263	72
2	490	453	270	43
TOTAL	1033	900	533 (51,59)¹	115 (11,13%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.

Anexo 6

Total de oócitos, estruturas para cultivo, clivados e embriões produzidos *in vitro* no grupo em que se associa ao gradiente de sexagem a redução da maturação para 18 horas.

REPETIÇÃO	Nº DE OOCITOS UTILIZADOS	Nº DE ESTRUTURAS PARA CULTIVO	Nº DE EMBRIÕES CLIVADOS	Nº DE EMBRIÕES PRODUZIDOS
1	300	246	213	64
2	280	256	226	57
TOTAL	580	502	439 (75,68%)¹	121 (20,86%)²

1- Porcentagem do total de embriões clivados em relação ao número total de oócitos.

2- Porcentagem do total de embriões produzidos em relação ao número total de oócitos.