

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

SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS POR
CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE
CONTÍNUO DE PERCOLL E OPTIPREP

Max Vitória Resende
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2007

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

SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS POR
CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE
CONTÍNUO DE PERCOLL E OPTIPREP

Max Vitória Resende

Orientadora: Profa. Dra. 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

Novembro de 2007

Resende, Max Vitória
R433s Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em
gradiente de densidade contínuo de Percoll e OptiPrep / Max Vitória
Resende. – Jaboticabal, 2007
xiii, 63 f.: il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Banca examinadora: Claudia Lima Verde Leal, Lia de Alencar
Coelho, Cesar Roberto Esper, Gilson Hélio Toniollo
Bibliografia

1. Espermatozoides bovinos. 2. Sexagem. 3. Gradiente de
densidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:612.6.057:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE CONTÍNUO DE PERCOLL E OPTIPREP

AUTOR: MAX VITORIA RESENDE

ORIENTADORA: Dra. VERA FERNANDA MARTINS H. DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Dra. VERA FERNANDA MARTINS H. DE LIMA

Dra. LIA DE ALENCAR COELHO

Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

Data da realização: 09 de novembro de 2007.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. VERA FERNANDA MARTINS H. DE LIMA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Max Vitória Resende - nascido em 22 de Julho de 1976, na cidade de Salvador-BA, onde concluiu o Ensino Médio em Dezembro de 1995. Ingressou em Março de 1996 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia - Salvador-BA. Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) na área de Reprodução Animal. Gradou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia - Salvador-BA em setembro de 2001, obtendo a maior pontuação da Região Nordeste no Exame Nacional de Cursos (Provão) do MEC. Em março de 2002, 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, concluindo em Fevereiro de 2004. Ingressou em Março de 2004 no curso de doutorado nesta mesma instituição.

DEDICO

A minha noiva Adriana Oliveira de Almeida, pelo amor, carinho e amizade incondicionais que sempre dedicou a mim. Adriana soube suportar a distância, por várias vezes, mas tinha a certeza, que mais esta etapa era necessária para o nosso crescimento. Obrigado. Você é e sempre será o meu sol. Amo-te!

A meu pai, Prof. José Resende (*in memorian*), exemplo de profissional que me mostrou como exercer com ética, profissionalismo e humildade, a profissão de Médico Veterinário,

Aos meus padrinhos (e sogros), José Martins de Almeida e Maria da Conceição Oliveira de Almeida, por sempre estarem presentes na minha vida e pelo carinho, amor e ajuda dispensados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para a conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais, José Resende (*in memoriam*), e a Maria Isis Vitória Resende.

À Profa. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima pela amizade construída, conselhos e ajuda durante este seis anos de convivência, que se perduram desde o estágio de graduação, e com certeza por muito mais tempo.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Dr. Cesar Roberto Esper, Dr. Francisco Guilherme Leite, Dr. Gilson Hélio Toniollo, Dr. Luis Francisco Prata, Dr. Joaquim Mansano Garcia, Dra. Maria da Glória Buzinaro, Dr. Paulo Henrique Franceschini, Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e defesa, pela presença e sugestões a este trabalho: Dr. Cesar Roberto Esper, Dra. Claudia Lima Verde Leal, Dr. Danísio Prado Munari, Dr. Gilson Hélio Toniollo, Dra. Lia de Alencar Coelho, Dra. Lucia Maria Carareto Alves, Dra. Sandra Aidar de Queiroz.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de fazer a pós-graduação e pela excelente infra-estrutura que foi imprescindível para a realização dos trabalhos.

Ao amigo, Rodrigo de Oliveira Vieira e sua família (Luis Fernando, Vó Zenaide e Micheli) pela grande amizade e carinho dedicados a mim;

Aos casais de amigos irmãos Michelly Fernandes de Macedo & Marcelo Barbosa Bezerra e Juliana Correa Borges Silva & Márcio Ribeiro Silva pela amizade verdadeira construída aqui em Jaboticabal e que, com certeza, se perdurará por toda

a vida, onde quer que estejamos. Em especial a Marcelo & Michelly pela amizade “meteórica” e por ter me acolhido em sua casa nos meus últimos meses aqui em Jaboticabal.

Não poderia deixar de citar os casais, Amélia Lizziane Leite Duarte & Diego Resende de Queiro Porto, e Katyane de Sousa Almeida & Fagner Luiz da Costa Freitas pela ótima convivência e amizade aqui em Jaboticabal.

Aos cunhados, Leandro Oliveira de Almeida e Luciano Oliveira de Almeida pelos momentos de alegria proporcionada em Salvador e por estarem dispostos a ajudar sempre que preciso.

Aos colegas da pós-graduação: Aline Costa de Lúcio, Christina Ramires Ferreira, Clara Slade Oliveira, Felipe Perecin (salvador da pátria do PCR em tempo real), Frederico Ozanan Barros Monteiro, Leonardo de Oliveira Seno, Letícia Zoccolaro, Lorivaldo Paz Landim Junior, Mabel Freitas Cordeiro, Naiara Zoccal Saraiva, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, pelos anos de convivência e por me ajudarem de forma direta ou indireta.

Ao Departamento de Tecnologia (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas), nas pessoas da Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Dra. Lucia Maria Carareto Alves e Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza por disponibilizar o equipamento de PCR em tempo real e auxílio inicial durante esta fase do experimento.

Aos funcionários da Reprodução Animal, Isabel Aparecida Penariol Natarelli, Ivo Luiz de Almeida Junior, Paulo Sérgio da Silva e Roberta Vantini, por estarem sempre prontos a ajudar independente do momento. Roberta, pela amizade e pela ajuda indispensável no laboratório. Agradeço em meu nome e de minha noiva ao Ivo Luiz, pela grande ajuda nos momentos difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, João Airton Boer e Paulo Antonio Tosta pelo auxílio na leitura das lâminas da técnica de TUNEL e preparo do fenol.

À Maria Aparecida Dias Tostes (Cidinha) e Rodrigo Roberto Figueira por estarem sempre disponíveis nos momentos de necessidade;

À seção de pós-graduação em nome da coordenadora (Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado) e de suas funcionárias pela ajuda com a documentação necessária para finalizar o doutorado.

Aos mototáxis Gilson Donizete Garcia e Renato Garcia pela ótima prestação do serviço de coleta dos ovários.

Aos estagiários pelo auxílio na execução dos experimentos;

Aos animais, por contribuir, mesmo que inconscientemente, ao progresso da ciência e do desenvolvimento humano.

À Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, por minha formação na área de Medicina Veterinária, e onde começou meu interesse em aprofundar-me ainda mais no mundo da ciência.

Ao CNPq pelo suporte financeiro a este trabalho.

Este trabalho obteve suporte financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob forma de bolsa de doutorado (processo 04/06044-0) e auxílio à pesquisa (processo 05/59357-9).

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	x
Resumo	xii
Summary	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Importância da seleção do sexo em mamíferos	3
2.1.1 Aplicações na produção animal e no melhoramento genético de rebanhos bovinos	3
2.1.2 Associação com outras biotecnologias da reprodução	4
2.2 Estratégias para alterar a proporção sexual em mamíferos	5
2.2.1 Estratégias inerentes a fatores externos aos espermatozóides.....	6
2.2.2 Estratégias inerentes às diferenças entre os espermatozóides X e Y	7
2.2.2.1 Características do Percoll como substância formadora de gradiente.....	14
2.2.2.2 Características do OptiPrep como substância formadora de gradiente ...	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção dos espermatozóides	15
3.2 Centrifugação dos espermatozóides em gradiente de densidade	15
3.2.1 Preparo dos gradientes de Percoll e OptiPrep	15
3.2.2 Centrifugação e recuperação dos espermatozóides nos gradientes de sexagem.....	16
3.3 Controle de qualidade dos espermatozóides.....	17
3.3.1 Viabilidade espermática e integridade acrossomal	17
3.3.2 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozóides.....	19
3.3.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)	20
3.3.3.1.Obtenção e seleção dos oócitos.....	21
3.3.3.2 Maturação <i>in vitro</i>	21
3.3.3.3 Fecundação <i>in vitro</i>	21

3.3.3.4 Cultivo <i>in vitro</i>	22
3.4 Validação dos resultados	23
3.4.1 Predição da proporção espermatozóides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas em gradiente de densidade pela amplificação dos genes <i>SRY</i> e <i>PLP</i> pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	23
3.4.2 Verificação do desvio da proporção sexual pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos embriões produzidos <i>in vitro</i>	26
3.5 Forma de análise dos resultados	28
3.5.1 Predição da proporção espermatozóides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas em gradiente de densidade de Percoll, OptiPrep e grupo controle (não centrifugado)	28
3.5.2 Desvio da proporção sexual dos embriões PIV	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Centrifugação em gradiente de densidade	29
4.2 Avaliação da viabilidade espermática e integridade acrossomal pela coloração com Azul de Tripán/Giemsa.....	31
4.3 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozóides.....	34
4.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)	35
4.5 Identificação do sexo genético dos embriões produzidos <i>in vitro</i> pela PCR.....	36
4.6 Predição da proporção espermatozóides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas pela qPCR.....	39
5. DISCUSSÃO.....	42
5.1 Centrifugação em gradiente de densidade e proporção sexual.....	42
5.2 Avaliação da viabilidade espermática e integridade acrossomal pela coloração com Azul de Tripán/Giemsa.....	45
5.3 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozóides.....	47
5.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)	48
5.6 Predição da proporção espermatozóides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas pela qPCR.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ Ct – Diferença entre ciclos do “threshold”
 μ L – microlitro
BSA – Albumina Sérica Bovina
COC – Complexo *Ccumulus*-Oócito
Ct – Ciclo do “threshold”
CtX - Ciclo do “threshold” do X (*PLP*)
CtY - Ciclo do “threshold” do Y (*SRY*)
DMEM – Meio Dulbecco Eagle’s Modificado
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ER – Eficiência da reação
ERX – Eficiência da reação do *PLP* do cromossomo X
ERY - Eficiência da reação do *SRY* do cromossomo Y
FAM - 6-carboxifluoresceína
FISH – hibridização *in situ* por fluorescência
FIV – Fecundação *in vitro*
G6PD - glicose-6-fosfato-desidrogenase
HPRT - hipoxantina fosforilbósil transferase
IA – Inseminação Artificial
mL – mililitro
mM – milimolar
ng – nanograma
pb – pares de bases
PBS – Tampão fosfato salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH - potencial Hidrogeniônico
PIV – Produção *in vitro*
PLP – Gene “Proteolipid Protein”
PVP – Povinilpirrolidona
qPCR – PCR quantitativa em tempo real
SE – Solução estoque
SFB – Soro fetal bovino

SOF – Fluido sintético de oviduto

SRY – Gene “Sex-determining Region Y”

TALP – “Tyrode’s Albumin Lactate Pyruvate”

TAMRA - 6-carboxitetrametilrodamina

TBE - TRIS (Hidroximetil Amino Metano), Ácido Bórico e EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético)

TCM – Meio para cultivo de tecidos

TE – Transferência de embriões

TUNEL – “Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling”

VI – Espermatozóide vivo com acrossoma intacto

VSA – Espermatozóide vivo sem acrossoma

xg – vezes a gravidade

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias de motilidade e vigor antes e após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep, e média da taxa de recuperação de espermatozóides nas diferentes raças Gir e Jersey	29
Tabela 2. Classes de espermatozóides, expressas em porcentagens, em relação às raças Gir e Jersey	31
Tabela 3. Classes de espermatozóides, expressas em porcentagens, em relação aos gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep e o grupo controle ...	33
Tabela 4. Número de oócitos, taxa de clivagem e de blastocisto durante a PIV de embriões bovinos utilizando espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e o grupo controle (não centrifugado)	36
Tabela 5. Agrupamento dos resultados provenientes do número de oócitos, taxa de clivagem e de blastocisto durante a PIV de embriões bovinos em relação às raças Gir e Jersey	36
Tabela 6. Proporção sexual obtida com embriões produzidos <i>in vitro</i> com espermatozóides sexados por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e do grupo controle	38
Tabela 7. Proporção sexual obtida com embriões produzidos <i>in vitro</i> com espermatozóides sexados por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e do grupo controle	38
Tabela 8. Valores médios de eficiência de amplificação para os genes PLP e SRY e porcentagem de cromossomos X e Y em amostras, submetidas à qPCR, contendo DNA de sangue e de espermatozóides submetidos e não submetidos à centrifugação	40

Tabela 9. Porcentagem de fêmeas obtidas pela PCR dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , e a porcentagem de cromossomos X obtidos do DNA de espermatozoides pela qPCR nos grupos Percoll, OptiPrep e Controle	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Montagem de um gradiente de densidade com auxílio de um pipetador de repetição	16
Figura 2. Classes de espermatozóides analisadas pela técnica de coloração Azul de Tripán/Giemsa. A: Espermatozóide vivo com acrossoma intacto. B: Espermatozóide vivo sem acrossoma. C: Espermatozóide morto com acrossoma. D: Espermatozóide morto sem acrossoma. Fotografia digital obtida a partir da ocular do microscópio. Aumento mínimo de 1000X. Utilizou-se o “zoom” do equipamento de fotografia digital, devido a isso, os espermatozóides não estão em um mesmo aumento	19
Figura 3. Exemplo de curvas de amplificações (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) pela PCR em tempo real e a linha de “threshold”. O ciclo do “threshold” (Ct) para cada amostra é o ponto onde a curva de amplificação cruza a linha (indicado pela seta em vermelho)	25
Figura 4. Motilidade antes e após a centrifugação nos gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep nas raças Gir e Jersey	30
Figura 5. Taxa de recuperação dos espermatozóides após centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep nas raças Gir e Jersey	31
Figura 6. Classes de espermatozóides em relação às raças Gir e Jersey. VI = Vivo com acrossoma intacto; VSA = vivo sem acrossoma. Colunas com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)	32
Figura 7. Classes de espermatozóides, expressas em porcentagens, para o grupo Percoll, OptiPrep e Controle. VI = Vivo com acrossoma intacto; VSA = vivo sem acrossoma. Colunas com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)	34

- Figura 8. Espermatozóides submetidos à técnica de TUNEL para verificação de fragmentação de DNA, sob microscopia de fluorescência. A: espermatozóides sem fragmentação de DNA. B: espermatozóides do controle positivo (adição de DNase) apresentando fragmentação de DNA, indicados pelas cabeças de seta. Fotografia digital com aumento de 1000X 35
- Figura 9. Representação de um gel de agarose a 2% com os padrões de amplificação pela PCR de DNA de embriões bovinos produzidos in vitro corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos com 280pb, 210pb e 196pb. Legenda: L (“ladder”: 100pb, Invitrogen, San Diego, EUA), F (embrião fêmea), M (embrião macho), CM (controle com DNA de macho), CF (controle com DNA de fêmea) e B (branco – sem DNA) 39

SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE CONTÍNUO DE PERCOLL E OPTIPREP

RESUMO – Os objetivos deste trabalho foram de facilitar os procedimentos de formação de gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep para separação de espermatozóides X; avaliar a eficiência da sexagem de espermatozóides X, a viabilidade espermática e integridade do acrossoma e do DNA após a centrifugação nestes gradientes e avaliar taxa de clivagem e blastocisto durante a produção *in vitro* de embriões. Para isso, doses de sêmen de touros foram descongeladas e cerca de 40 milhões de espermatozóides foram colocados sobre cada gradiente de densidade compostos por Percoll ou OptiPrep com três camadas que variaram entre 1.110g/mL a 1.123g/mL em tubos de poliestireno de 15mL. Centrifugou-se o gradiente a 500xg por 15 min a 22°C. Os sobrenadantes foram aspirados e recuperados para verificação da viabilidade espermática e integridade do acrossoma, fragmentação do DNA, produção *in vitro* de embriões, avaliação da eficiência da sexagem pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e sexagem dos embriões pela PCR. A porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto diminuiu ($P<0,05$) após a centrifugação nos gradientes de densidade, mas não influenciou, de modo geral, a produção *in vitro* de embriões (taxa de clivagem e blastocistos) utilizando estes espermatozóides centrifugados. Não foi detectada fragmentação do DNA dos espermatozóides nas amostras centrifugadas. Os resultados demonstraram que o Percoll enriqueceu as amostras com espermatozóides X (62% de fêmeas, $P<0,05$). No OptiPrep e grupo Controle a porcentagem de fêmeas foi de 47,1 e 48,7%, respectivamente. Estes resultados foram confirmados pela qPCR do DNA dos espermatozóides, com uma subestimação apenas no Percoll. Foi possível realizar a sexagem, por uma metodologia mais simples, facilitando o procedimento de centrifugação em gradiente de densidade e sem provocar danos aos espermatozóides.

Palavras-chave: bovino, seleção do sexo, gradiente de densidade, sêmen, embrião, PCR em tempo real

SEXING BOVINE SPERM BY CENTRIFUGATION IN CONTINUOUS PERCOLL AND OPTIPREP DENSITY GRADIENT

SUMMARY – The objectives of this work were to facilitate the procedures of formation of density gradients of Percoll and OptiPrep for separation of X-bearing bovine spermatozoa; to evaluate the efficiency of sexing and viability of acrosome integrity and DNA after centrifugation in these gradients and to assess the cleavage and blastocyst rate during in vitro production of embryos. For this, frozen-thawed spermatozoa (20 to 40 millions) were deposited on each density gradient composed of Percoll or OptiPrep with three layers that varied between 1.110g/mL to 1.123g/mL, in 15mL polystyrene tubes. The tubes were centrifuged at 500xg for 15 min at 22°C. Supernatants were carefully aspirated and sediments recovered for verification of sperm quality, DNA fragmentation, in vitro fertilization of embryos, evaluation of the efficiency of sexing by real time polymerase chain reaction (qPCR) and sexing of embryos by PCR. Percentage of live spermatozoa with intact acrosome decreased ($P<0.05$) after centrifugation in density gradients, however, it not influence, in general, the production of embryos in vitro (cleavage and blastocyst rates) using these centrifuged sperm. No sperm DNA fragmentation was detected in centrifuged samples. The results of embryo sexing by PCR showed deviation to female in the Percoll group (62%, $P<0.05$). In the OptiPrep and Control group the percentage of females was 47.1 and 48.7%, respectively. These results were confirmed by qPCR of DNA of spermatozoa, with an underestimation only in the Percoll group. It was possible the sexing, by a simple approach, facilitating the process of the centrifugation in density gradient and without damage to sperm.

Keywords: bovine, sex selection, density gradient, semen, embryo, real time PCR

1. INTRODUÇÃO

O interesse do homem pela seleção do sexo da progênie, data da época anterior a Cristo, e ao longo de muitos anos, vários métodos têm sido sugeridos e testados para tentar influenciar a proporção dos nascimentos dos descendentes do sexo masculino ou feminino (AMANN, 1989; REUBINOFF & SCHENKER, 1996). Muitos desses métodos eram baseados em crenças populares, como a retirada de um dos testículos devido à convicção de que o nascimento de meninos era proveniente de espermatozóides do testículo direito ou esquerdo (WINDSOR et al., 1993; REUBINOFF & SCHENKER, 1996). A partir de 1910, com a descoberta dos cromossomos sexuais acessórios (X e Y), a pré-seleção do sexo seguiu um direcionamento científico, e ao longo deste período, muitos métodos foram pesquisados para a separação das duas populações de espermatozóides. No entanto, não foram confirmados em estudos posteriores (MORUZZI, 1979; JOHNSON, 1995; SEIDEL Jr., 2007). Até o momento, as técnicas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X e Y, são as únicas validadas cientificamente (JOHNSON, 1995; JAFAR & FLINT, 1996; JOHNSON, 2000; GARNER, 2006).

Uma destas técnicas é a citometria de fluxo, em que se utiliza de um equipamento munido de um “laser” e é capaz de separar as duas populações de espermatozóides com uma acuidade de mais de 90%. No entanto, possui algumas desvantagens que limitam o seu emprego, dentre estas o custo do equipamento e os danos provocados aos espermatozóides durante o processo de sexagem (SEIDEL Jr., 2003a).

Utilizando-se de uma metodologia bem mais simples, a centrifugação em gradiente de densidade é capaz de separar os espermatozóides X dos Y a um custo bem menor e sem prejuízos a viabilidade espermática, apesar de uma acuidade menor (ao redor de 70%) à obtida na citometria de fluxo (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA, 2005). Em estudos anteriores, foram constatadas algumas

dificuldades que impedem a produção do gradiente de densidade em larga escala. Dentre estas, a impossibilidade de armazenamento dos gradientes, pois deve ser utilizado imediatamente após colheita ou descongelamento do sêmen, e a dificuldade de confecção pela utilização de várias camadas, que depende muito da habilidade individual de cada técnico (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Deste modo, os objetivos deste trabalho foram:

a) facilitar os procedimentos de formação e armazenamento de gradientes de densidade composto por Percoll e OptiPrep;

b) avaliar a viabilidade espermática, após a utilização de gradientes de densidade, pela coloração do acrossoma, determinação da fragmentação do DNA e sua influência nos parâmetros da produção *in vitro* dos embriões (taxa de clivagem e de blastocisto);

c) comparar o Percoll e o OptiPrep quanto à eficiência no sistema de centrifugação em gradiente densidade e na separação de espermatozóides portadores do cromossomo X, pela sexagem dos embriões produzidos *in vitro* utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

d) desenvolver um gradiente de sexagem para a separação de espermatozóides X viáveis, que substitua o gradiente de lavagem de espermatozóides usado na rotina da produção *in vitro* de embriões;

e) verificar os resultados da sexagem utilizando o DNA dos espermatozóides submetidos à centrifugação, por amplificação dos genes *PLP* (cromossomo X) e do *SRY* (cromossomo Y), pela PCR quantitativa em tempo real.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância da seleção do sexo em mamíferos

2.1.1 Aplicações na produção animal e no melhoramento genético de rebanhos bovinos

Dentre as vantagens oferecidas no uso da sexagem de espermatozoides em propriedades produtoras de leite, pode-se destacar: a possibilidade do nascimento de grande número de fêmeas provenientes de acasalamentos programados, assegurando, a reposição do rebanho (HOHENBOKEN, 1999; HAFEZ & HAFEZ, 2004; SEIDEL Jr., 2007).

O nascimento de machos em rebanhos leiteiros no Reino Unido leva ao abate ou a venda, por um valor monetário muito pequeno, 600.000 bezerros por ano ocasionando grande prejuízo financeiro (LU et al. 1999). Além disso, em raças especializadas para a produção de leite, a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino é um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). Em sistema de produção de carne, uso de espermatozoides sexados assegura o nascimento de progênie masculina, o que é interessante no momento do abate, já que o macho possui peso 25% maior do que a fêmea aos 24 meses (GORDON, 1994).

Em relação ao melhoramento genético, a sexagem de espermatozoides permite o aumento do número de indivíduos de um dos sexos (masculino ou feminino) na progênie de uma população, incrementando a intensidade de seleção (BEKMAN et al., 1994). A utilização da seleção do sexo diferiu nas raças com aptidão para a produção de carne e leite, entre os rebanhos comerciais e núcleos de criação. Estimou-se que a seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite ou carne e em sistemas onde a

produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR et al., 1985; Van VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992; HOHENBOKEN, 1999; HABERMANN et al., 2005). Entretanto, esses autores salientaram que os benefícios só serão observados se as técnicas de seleção do sexo não diminuïrem a eficiência reprodutiva (por exemplo, taxas de prenhez inferiores a 60%). O progresso genético poderá ser maximizado em programas de criação para a produção de leite em que a proporção sexual é controlada por ocasião da inseminação artificial, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (Van VLECK et al., 1987; HOHENBOKEN, 1999, HABERMANN et al., 2005).

Van VLECK (1981) estimou que a taxa de progresso genético poderia aumentar em 15%, com a utilização de sêmen com espermatozóides sexados, quando utilizada em rebanhos comerciais para produzir novilhas. DEMATAWEWA & BERGER (1998) estimaram um ganho genético anual muito menor, em torno de 9%. ABDEL-AZIM & SCHNELL (2007) monitoraram 20 anos de seleção em gado de elite e comercial leiteiro, para quantificar o ganho genético à primeira lactação. Constatou-se que a superioridade, em comparação com rebanhos sem uso de espermatozóides sexados, era de 30% no 11º ano, porém, decresceu para 9% no 20º ano.

A importância dessa tecnologia é a sua utilidade para maximizar a produção animal com menor custo. A possibilidade de produzir, em escala comercial, doses de sêmen enriquecido com espermatozóides X ou Y aumentará os benefícios da utilização da IA, conferindo-lhe papel relevante na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

2.1.2 Associação com outras biotecnologias da reprodução

A partir da década de 80, o aprimoramento e a difusão da técnica de transferência de embriões (TE), intensificaram o estudo e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo de espermatozóides e embriões pré-implantados, em espécies de interesse zootécnico. Estimou-se que em programas de melhoramento genético, a sexagem de espermatozóides, associada à inseminação artificial ou

transferência de embriões, incrementaria o melhoramento genético animal pelo aumento do progresso genético anual em até 25% para produção de leite e carne (HOHENBOKEN, 1999).

Em associação com a produção *in vitro* de embriões, a sexagem de espermatozóides minimizaria o custo do teste de progênie em 33% já que permitiria apenas a transferência dos embriões do sexo desejado (NICHOLAS, 1996).

A sexagem de espermatozóides, associada a outras biotecnologias da reprodução (IA, TE e PIV) tem um mercado potencial atrativo para bovinos já que o Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, com 207 milhões de cabeças (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005).

O número crescente de rebanhos submetidos a programas de melhoramento genético e cruzamento industrial, que tem tido crescimento expressivo desde 1989, o que possibilitou um crescimento de 246% da IA nos últimos 20 anos. Estes mesmos programas é que permitem que, atualmente, as vendas de sêmen sustentem-se em um patamar de 7 milhões de doses por ano, sendo que 67,1% destas doses são produzidas aqui mesmo no Brasil (Associação Brasileira de Inseminação Artificial, 2006).

Em relação à PIV, relatou-se que em 2005, em torno de 265 mil embriões bovinos produzidos *in vitro* foram transferidos (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, 2006). A América do Sul, na sua grande maioria o Brasil, deteve 50% do total de embriões produzidos *in vitro* e transferidos no mundo. Esse número representa, em média, 43% dos embriões coletados *in vivo* e transferidos no mundo, o que correspondeu a, aproximadamente, 612 mil embriões (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, 2006).

2.2 Estratégias para alterar a proporção sexual em mamíferos

As estratégias que podem ser utilizadas na tentativa de desenvolver técnicas de separação de espermatozóides estão relacionadas a fatores externos aos espermatozóides ou às diferenças entre os espermatozóides X e Y, como será descrito a seguir:

2.2.1 Estratégias inerentes a fatores externos aos espermatozóides

a) pH do sistema genital feminino

Em mulheres (JAMES, 1992) e cadelas (MURI, 2004), o pH ácido (menor que 7,3) favorece o nascimento de fêmeas;

b) Nutrição materna antes e durante a gestação

O consumo de gordura saturada promoveu um maior nascimento de indivíduos do sexo masculino, este fato, observado em mulheres (JAMES, 1999) e em murinos (MOLES et al., 2003; ROSENFELD et al., 2003). Contrariando os estudos anteriores, observou-se que, em murinos, a alimentação com ácidos graxos polinsaturados ômega 3 e ômega 6, promoveram o nascimento de fêmeas (FOUNTAIN et al., 2007). Em cadelas, observou-se que a ingestão de ácido ascórbico promoveu um maior nascimento de fêmeas (MURI, 2004).

c) Concentração hormonal do macho e da fêmea no momento da cópula

Neste caso, quando existe maior concentração de testosterona, a probabilidade de nascimentos de progênie do sexo masculino é maior. O mecanismo ainda é desconhecido, mas o glicerilfosforilcolina (GCP) e a glicerilfosforilcolina diesterase (GCPD) podem estar envolvidos juntamente com os hormônios, atuando no desvio da proporção sexual (ASTOLFI et al., 2001; RYAN & VANDENBERG, 2002; EHMAN & SCOTT, 2002);

d) Momento da inseminação ou cópula em relação à ovulação

Em mulheres (JAMES, 2000), em bovinos (PURSLEY et al., 1998; RORIE, 1999; MARTINEZ et al., 2004; ROELOFS et al., 2006), em eqüinos (FERRAZ, 2005) e em suínos (SOEDE et al., 2000), onde o mecanismo seria a alcalinização do sistema reprodutivo da fêmea, próximo à ovulação, favorecendo espermatozóide X. Pelos menos em bovinos e em suínos, os dados são contrastantes, indicando que não existe alteração da proporção sexual relacionado ao tempo de IA e ovulação (RORIE, 1999; SOEDE et al., 2000; ROELOFS et al., 2006);

e) Condições de cultivo durante a PIV de embriões bovinos

Presença de glicose e glicosamina (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001, 2004; RHEINGANTZ et al., 2004; KIMURA et al., 2006), tempo de maturação do oócito

(AGUNG, 2006) e tempo de interação entre o espermatozóide e o oócito (IWATA, 2007). Todos estes fatores favorecem o desenvolvimento de embriões machos com maior rapidez do que os embriões fêmeas;

f) Seleção diferencial pelo oócito dos espermatozóides X ou Y no momento da fecundação em bovinos

Alterações no sistema de microtúbulos do oócito favorecendo o processamento do cromossomo Y e, conseqüentemente, alterando a proporção sexual dos embriões para o sexo masculino (ZUCCOTTI et al., 2005; AGUNG, 2006).

A existência de dificuldades na manipulação das possíveis diferenças enumeradas acima, grande variabilidade entre espécies, e, principalmente, a falta de consenso dos resultados da literatura, torna-se difícil a criação de uma técnica baseada nestes fatores, porém a utilização em conjunto, quando pertinente, com técnicas já validadas não pode ser descartada.

Devido a isso, atualmente, somente as técnicas de separação que se baseiam na diferença entre os espermatozóides X e Y (conteúdo de DNA e densidade) estão sendo estudas e aprimoradas. Por fim, dentre as técnicas citadas, as únicas validadas cientificamente são as que se apóiam na diferença de DNA entre as duas populações de espermatozóides (X e Y), que é a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; SEIDEL Jr., 2003b; GARNER, 2006).

2.2.2 Estratégias inerentes às diferenças entre os espermatozóides X e Y

a) Diferença no conteúdo de DNA

A identificação microscópica dos cromossomos sexuais (X e Y) em 1910 foi um marco no campo das pesquisas objetivando a sexagem de espermatozóides, pois geraram uma idéia de que o sexo poderia ser controlado por estas estruturas especializadas (SEIDEL Jr. & GARNER, 2002). Além disso, descobriu-se que a quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y variava significativamente entre as espécies e, até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente

para a separação eficiente de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON & WELCH, 1999).

Esta diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X e Y é cerca de 3 a 4% e foi constatada em pelo menos 23 espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994; GARNER, 2006). A menor diferença é de 2,3% e a maior, de 7,5%, encontrada, em um marsupial e na chinchila, respectivamente (GARNER, 2006). Em bovinos a diferença é, em média, de 3,8%, com maior diferença no *Bos taurus* em relação ao *Bos indicus*, por exemplo, na raça Jersey a diferença entre o espermatozóide X e Y chega a 4,24%, e a menor diferença encontrada é na raça Brahman (3,73%), sendo que fato está relacionado ao tamanho do cromossomo Y (GARNER et al., 1983).

Apesar de uma acuidade de separação de espermatozóides X e Y alcançar os 90% (CRAN, 2007), a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento, devido ao custo, ao redor de US\$ 350.000 (CHECK et al, 2000; CRAN, 2007; SEIDEL Jr., 2007), é razoavelmente complicado de se manusear, necessitando de operadores treinados demandando custo de treinamento (SEIDEL Jr., 2007) e pela baixa produção/equipamento/hora, em torno de 10 a 15 milhões de espermatozóides em alta velocidade de separação, em operação de rotina (JOHNSON & WELCH, 1999; SEIDEL Jr. & GARNER, 2002; SEIDEL Jr., 2003a; CRAN, 2007; HAMANO, 2007), e ainda podendo variar devido à característica assimétrica das células espermáticas e acuidade que se deseja obter. Deste modo, esta baixa produção restringe sua utilização na indústria da inseminação artificial.

Outros fatores limitantes da técnica de citometria de fluxo podem ser observados:

a) o baixo número de espermatozóides sexados viáveis, com doses para inseminação contendo cerca de 2 milhões de espermatozóides (SEIDEL Jr., 2007);

b) diminuições nos parâmetros de fertilidade avaliados *in vivo* e *in vitro*, inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (BEYHAN et al., 1999; SEIDEL Jr. & GARNER, 2002; BODMER, 2005; MORTON et al., 2007);

c) a necessidade de utilizar sêmen *in natura*, pois o processo de congelamento dos espermatozóides altera a uniformidade da coloração com o Hoescht 33342, que é necessário durante o processo de sexagem (JOHNSON, 1994).

Os fatores que influenciam negativamente e ocasionam a diminuição na viabilidade espermática durante a sexagem pela citometria são:

a) a longa exposição ao corante sob alta temperatura (pelo menos 1 hora a 37°C) (SPINACI et al., 2005);

b) exposição à alta pressão e à luz ultravioleta emitida pelo laser (BODMER, 2005);

c) rápida desaceleração dos espermatozoides na saída do citômetro, de 90Km/h para 0Km/h, quando estes são colhidos nos tubos coletores durante o processo de sexagem (SEIDEL Jr., 2003a).

Devido à diminuição da eficiência de sexagem de espermatozoides descongelados, já que a congelação prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos (JOHNSON, 1994), ocorre uma restrição na utilização dos melhores touros (touros provados), dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a produção *in vitro* de embriões.

Em um estudo recente, MORTON et al. (2007) verificaram que os embriões produzidos *in vitro* no qual se utilizou espermatozoides sexados por citometria, apresentavam transcrição alterada de alguns genes importantes no desenvolvimento dos embriões, comparado a embriões em que não se utilizou espermatozoides sexados. Dentre esses, o *Glut-3*, que é responsável pelo transporte da glicose para o interior do embrião, a sua expressão aumentada provocou um atraso no desenvolvimento. A Glicose-6-fosfato-desidrogenase (*G6PD*), que participa do processo de detoxificação celular frente aos radicais livres, ocorreu diminuição na sua expressão, e assim como o *Glut-3*, provocou um atraso no desenvolvimento. Outras alterações puderam ser encontradas na expressão dos genes *XIST*, envolvido na inativação do X, e HSP-70.1 que é um indicador de estresse embrionário.

Em bovinos, a literatura denota que os resultados de fertilidade a campo, utilizando os espermatozoides sexados por este método, demonstram índices similares comparados à utilização de espermatozoides não sexados, porém em condições experimentais estritamente controladas, o que inclui a inseminação artificial no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo realizada por técnicos treinados (SEIDEL Jr. et al., 1997, 1999) ou utilizando somente novilhas (DUARTE et al., 2007).

Observam-se ainda outras recomendações do uso de sêmen com espermatozóides sexados pela citometria de fluxo, como a utilização apenas em novilhas e vacas férteis com histórico reprodutivo excelente; em rebanhos que tenham um manejo nutricional, alimentar e sanitário adequado, e por último, este não pode ser utilizado em programas que utilizam inseminação artificial em tempo fixo.

Contrariando estes resultados, um estudo realizado na Suíça, no qual espermatozóides descongelados e sexados por citometria de fluxo e espermatozóides não sexados (2 milhões/dose) foram depositados no corpo do útero de novilhas e vacas. A taxa média de prenhez com espermatozóides sexados foi de 29,6% e 23,8%, para novilhas e vacas, respectivamente, enquanto que utilizando espermatozóides não sexados o índice foi 59,3% para novilhas e 26,6% para vacas, verificados aos 70 a 90 dias após a inseminação artificial (BODMER et al., 2005). Neste mesmo estudo foi constatada maior perda embrionária comparada com o grupo controle, quando utilizaram espermatozóides sexados por citometria, alcançando a taxa de 11,1% em novilhas e 15,8% em vacas, e em contraste, utilizando-se espermatozóides não sexados, a taxa foi de apenas 2,9% em vacas e de 0% em novilhas.

Nos Estados Unidos, resultados de um teste de campo compararam as taxas de prenhez, conseguidas com espermatozóides sexados por citometria de fluxo, em rebanhos com baixa, média e alta eficiência reprodutiva. A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional foi de 58%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozóides sexados nesses rebanhos as taxas de gestação foram 21, 37, e 35%, respectivamente (WEIGEL, 2004).

Na Finlândia, outro teste de campo, em uma cooperativa de produção de leite, comparou as taxas de prenhez, conseguidas com espermatozóides sexados por citometria de fluxo, utilizadas 157 doses, e com sêmen convencional, utilizadas 149 doses. A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional alcançou 46%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozóides sexados foi de 21%. Assim, nasceram mais bezerras após a IA com sêmen convencional (33 bezerras) do que com o sêmen sexado (27 bezerras) (ANDERSSON et al., 2006).

Considerando os resultados acima, torna-se evidente que os espermatozóides sexados por citometria de fluxo comprometem a taxa de prenhez, pelo menos

atualmente. Estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen deveriam ter como foco caminhos para se obter um benefício efetivo incluindo idade ao primeiro parto, frente ao custo de utilização (WEIGEL, 2004).

Além disso, cerca de 150 a 200 doses de sêmen enriquecidas com espermatozoides X podem ser produzidas, por dia, por citometria de fluxo, que é a técnica utilizada comercialmente, e isso compreende menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado dos Estados Unidos. Este fato associado à taxa de prenhez de novilhas a campo em torno de 35-40% e 55-60% utilizando sêmen sexado e convencional, respectivamente, são fatores limitantes para a utilização do sêmen sexado naquele país (WEIGEL, 2004).

Assim, é difícil concluir como seriam os resultados em países como o Brasil, que possuem uma pecuária caracterizada por heterogeneidade de condições de manejo, utilizando doses com concentrações baixas (2×10^6 espermatozoides/dose) comparando-se com doses com concentrações de mais de 15×10^6 espermatozoides/dose que são utilizadas em programas de IA. Neste sentido, considera-se que para a realidade brasileira, é mais interessante optar por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem em torno de 75%, mas que permita, em condições variadas de manejo, alcançar índices de fertilidade satisfatórios.

Além disso, apesar dos tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta) aparentemente não impedirem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, LIBBUS et al. (1987) observaram aberrações cromossômicas em 50% dos espermatozoides de *Microtus oregoni*, após a sexagem por esse método. Ademais, a licença para a utilização da sexagem por citometria de fluxo, é detida por poucas empresas que controlam e restringem a sua utilização comercial ou científica a poucos países e grupos de pesquisadores que visem a sexagem de espermatozoides humanos, bovinos e outras espécies de interesse zootécnico.

b) Diferenças de densidade

Esses métodos envolvem processos de centrifugação e se baseiam na diferença de densidade entre essas duas populações de espermatozóides. A análise da cabeça dos espermatozóides, por microinterferometria, demonstrou a existência de maior conteúdo de DNA e proteína nuclear nos espermatozóides X em relação aos espermatozóides Y, e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. Estimou-se que a diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozóides X e Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de pelo menos $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ ou 0,06% (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999).

KOBAYASHI et al. (2004) relataram que a separação das duas populações de espermatozóides poderia estar relacionada à motilidade dos espermatozóides antes da centrifugação. Segundo este trabalho, os espermatozóides X possuíam maior motilidade em relação aos espermatozóides Y no meio *in vitro*, fato confirmado após separação por citometria de fluxo e por sistema computadorizado. Com isso, esta motilidade afetaria a sedimentação dos espermatozóides no gradiente de densidade. Contrariamente, este fato não pode ser confirmado no trabalho de HOSSEPIAN DE LIMA (2005), onde as amostras que possuíam maior motilidade antes da centrifugação, não foram as que obtiveram melhor seleção de espermatozóides X, após a centrifugação.

Na tentativa de separação dos espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade utilizou-se Ficoll, Ficoll-Metrizoato de Sódio e Percoll (SHASTRY et al., 1977; KANEKO et al., 1983; Schwiderski et al., 1991 e Blotner et al., 1993 citados por HOSSEPIAN DE LIMA, 1998), e mais recentemente, utilizando Percoll e OptiPrep, obteve-se resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual e repetibilidade da técnica (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998, 2005; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000).

Em bovinos, desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll com acuidade de cerca de 73%. Quando utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998, 2005; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000). O aprimoramento deste

método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll e OptiPrep, principalmente no que se refere à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides. Neste aspecto, torna-se necessário o desenvolvimento de gradientes que possam ser confeccionados com menor grau de dificuldade e em menor tempo como os gradientes de densidade.

Existem dois tipos de gradientes de densidade:

a) gradientes de densidade: quando há um aumento gradual da densidade da parte superior do gradiente até a parte inferior, não havendo delimitação entre as camadas formadas previamente, formando um gradiente linear;

b) gradientes de densidade descontínuos: também há um aumento gradual da densidade da parte superior para a inferior, contudo este tipo possui camadas definidas, e a depender das concentrações utilizadas, é possível a visualização dessas camadas.

Para a formação do gradiente de densidade, há necessidade de se montar um gradiente descontínuo de três a quatro camadas, inicialmente, na qual a transformação ocorre pela difusão destas camadas, utilizando algumas técnicas como a colocação do tubo na horizontal e, após um período de tempo recolocado na posição vertical; congelação e descongelação; resfriamento por no mínimo 10h; ou a utilização de um equipamento denominado de Gradient Master™, que demanda maior investimento, mas obtendo-se maior precisão e rapidez na confecção dos gradientes.

A vantagem do gradiente de densidade é a possibilidade de confecção com densidades maiores (e de maior resolução) e poder ser estocado, ao contrário do gradiente descontínuo, caso ocorra estocagem, suas camadas se misturam, havendo a necessidade de ser preparado momentos antes da utilização.

Na espécie humana, os métodos de centrifugação em gradiente de densidade com Percoll, tanto no intuito de sexagem, como para separação de espermatozóides viáveis para procedimentos como IA e PIV, apesar de satisfatórios, pois o Percoll permite um alto nível de resolução, o seu uso clínico foi suspenso. Isto se deveu ao fato de que, na espécie humana, o Percoll ocasionou o aparecimento de endometrite nas mulheres inseminadas com sêmen previamente centrifugado em gradiente de densidade composto por meios coloidais cuja composição contém sílica (MAKKAR et

al., 1999), além da suspeita de contaminação com endotoxinas (McCANN & CHANTLER, 2000; MOUSSET-SIMÉON et al., 2004). Em um estudo anterior, foram desenvolvidos gradientes de OptiPrep e demonstrado que em vacas, não houve comprometimento da fertilidade (taxa de prenhez de 80%) após inseminação com espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade feito com OptiPrep, deste modo podendo substituir o Percoll (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

2.2.2.1 Características do Percoll como substância formadora de gradiente

O Percoll™ é um meio bem referenciado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares. A solução estéril é composta por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona (PVP). Com o Percoll é possível a formação de gradientes com densidade de até 1.130g/mL, com osmolaridade menor que 300 mOSm/Kg H₂O. Para isso, é necessário preparar uma solução estoque contendo nove partes de Percoll™ e uma parte de solução com 1,5M de NaCl ou 2,5M de sacarose (VICENT & NADEAU, 1984).

2.2.2.2 Características do OptiPrep como substância formadora de gradiente

O OptiPrep® (solução estéril e não-tóxica composta de Iodixanol a 60% peso/volume - diluído em água) é um componente iodinado não iônico desenvolvido para estudos envolvendo raios X (FORD et al., 1994) e sua fórmula química é 5,5 -[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)-bis(acetylimino)] bis-[N,N bis(2,3dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-benzenedicarboxamide], com peso molecular de 1550.

Na separação de organelas sub-celulares, o OptiPrep apresenta vantagens sobre o Percoll, já que é denso o suficiente para produzir gradientes com densidades de até 1.320 g/mL e com osmolaridade inferior a 300 mOsm/Kg H₂O (FORD et al., 1994; GRAHAM et al., 1994).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos espermatozoides

As doses de sêmen congeladas foram adquiridas de Empresas Especializadas em Congelação e Comercialização de Sêmen, de duas raças que possuem aptidão leiteira (Gir e Jersey), devido ao objetivo de separação de espermatozoides X proposto neste trabalho. Foram utilizados quatro touros, dois para cada raça, sendo que as doses de sêmen de cada um dos touros pertenciam à mesma partida.

3.2 Centrifugação dos espermatozoides em gradiente de densidade

3.2.1 Preparo dos gradientes de Percoll e OptiPrep

-Solução de trabalho para gradiente de Percoll™: foi preparada diluindo-se, em diferentes proporções, a solução estoque (SE) de Percoll™ (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), A SE composta por Percoll a 90%, pH 7,4; 280-290 mOsm/kg H₂O), em meio DMEM concentrado 10X (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D7777) contendo 0,3% de BSA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha, 12659) 10mg/L de antibiótico, 6mM de HEPES Sigma-Aldrich, St Louis, USA, H3375), pH 7,4, para obtenção de densidades entre 1.110 e 1.123g/mL.

-Solução de trabalho para gradiente de OptiPrep® foi preparada diluindo-se, em diferentes proporções, o OptiPrep® (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D1556) em meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D1152) contendo 0,3% de BSA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha, 12659), 10mg/L de antibiótico, 14,21mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, H7006), pH 7,4 para obtenção de densidades entre 1.110 e 1.123g/mL. Não houve a necessidade de se fazer uma solução estoque, pois o OptiPrep é comercializado pronto para uso.

O gradiente de densidade de Percoll ou OptiPrep foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, com auxílio de um pipetador de repetição (repipetador) – Figura 1, em tubos cônicos de poliestireno com capacidade para 15mL. Cada tubo com o gradiente de Percoll e OptiPrep continha três camadas de 3mL, com densidades variando de 1.110 e 1.123g/mL.



Figura 1. Montagem de um gradiente de densidade com auxílio de um pipetador de repetição.

3.2.2 Centrifugação e recuperação dos espermatozoides nos gradientes de sexagem

As doses de sêmen de 0,25mL foram descongeladas a uma temperatura de 35°C por 20 segundos, avaliando-se, em seguida, a motilidade, vigor e concentração espermática. A concentração foi determinada utilizando-se uma câmara de Neubauer, com o intuito de calcular a taxa de recuperação dos espermatozoides, após a centrifugação, no gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep. Foram depositados sobre cada gradiente, cerca de 40 milhões de espermatozoides. Os gradientes foram centrifugados a 500xg em rotor horizontal, por 15 minutos, na temperatura de 22 a

24°C. Os sobrenadantes de todos os tubos foram retirados com auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, acoplada a uma bomba de sucção. Os sedimentos contendo os espermatozóides foram recuperados com a utilização de um pipetador automático. A motilidade, vigor e a concentração foram novamente determinados para posterior comparação dos resultados pré e pós-centrifugação. Os espermatozóides recuperados foram utilizados nos procedimentos de controle de qualidade e validação dos resultados.

3.3 Controle de qualidade dos espermatozóides

Em todas as técnicas do controle de qualidade de espermatozóides, descritas a seguir, foi utilizada uma amostra de sêmen controle (não submetido a nenhum processo de centrifugação) de cada um dos touros, no intuito de comparar os resultados com os dos espermatozóides submetidos à centrifugação no gradiente de densidade de Percoll e Optiprep.

3.3.1 Viabilidade espermática e integridade acrossomal

Colheu-se uma fração de sêmen imediatamente antes e após a centrifugação em gradiente de densidade para avaliar a viabilidade espermática e integridade da membrana acrossomal utilizando-se metodologia desenvolvida por DIDION et al. (1989) com algumas modificações, por meio da dupla coloração Azul de Tripán/Giemsa.

Para isso, uma amostra de 20µL foi colocada em microtubo de 1,5mL, adicionou-se 20µL de Azul de Tripán 0,4% (Sigma, St. Louis, USA, T8154) e colocada em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionada à amostra, 1mL de água destilada, e centrifugou-se a 700xg por 5 minutos para a retirada do excesso de corante. Foram feitas duas lavagens para cada amostra. O sobrenadante foi retirado após cada lavagem, e o sedimento foi ressuspenso com 0,5mL de água destilada. Em seguida, foram feitos dois esfregaços que, após secos rapidamente em fluxo de ar, foram fixados em metanol por 5 minutos. Em seguida, os esfregaços foram colocados

em cubas próprias contendo corante Giemsa a 10% onde permaneceram por 18 a 20 horas.

Decorrido este período, as lâminas foram retiradas do corante e os espermatozóides analisados quanto à viabilidade espermática e integridade acrossomal, pela contagem de 200 espermatozóides de cada amostra, utilizando-se microscopia de luz comum e objetiva de imersão, com aumento de 1000X.

Os espermatozóides foram classificados em quatro classes distintas (Figura 2).

Classe 1: Espermatozóide vivo com acrossoma intacto: cabeça rosada com acrossoma rosado;

Classe 2: Espermatozóide vivo sem acrossoma: cabeça rosada ou branca com acrossoma descorado;

Classe 3: Espermatozóide morto com acrossoma intacto: cabeça azul ou roxa com acrossoma rosado;

Classe 4: Espermatozóide morto sem acrossoma: cabeça azul ou roxa com acrossoma descorado.

Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado para verificar diferenças das classes de espermatozóides em relação às raças (Gir e Jersey) e quanto aos gradientes de densidade (Percoll e OptiPrep) e o grupo controle (não submetido à centrifugação). No momento da análise estatística, as classes de espermatozóides mortos com acrossoma intacto e mortos sem acrossoma foram agrupadas, já que estas classes não representam uma população de espermatozóides viáveis. O nível de significância foi de 5%.

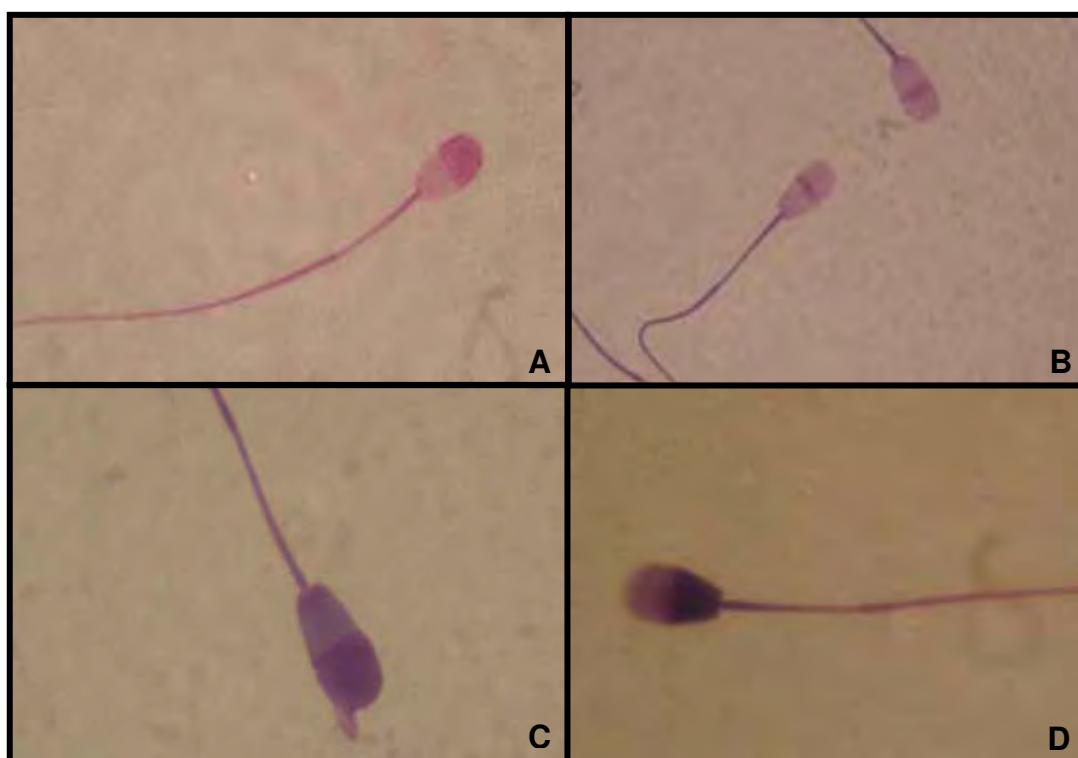


Figura 2: Classes de espermatozoides analisadas pela técnica de coloração Azul de Tripan/Giemsa. **A:** Espermatozóide vivo com acrossoma intacto. **B:** Espermatozóide vivo sem acrossoma. **C:** Espermatozóide morto com acrossoma. **D:** Espermatozóide morto sem acrossoma. Fotografia digital obtida a partir da ocular do microscópio. Aumento mínimo de 1000X. Utilizou-se o “zoom” do equipamento de fotografia digital, devido a isso, os espermatozoides não estão em um mesmo aumento.

3.3.2 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozoides

Uma outra fração de sêmen também foi colhida imediatamente após a centrifugação em gradiente de densidade para a verificação da frequência de danos no DNA pela técnica do TUNEL (“In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay”), baseado no protocolo de MARTINS et al. (2007a).

Para a técnica do TUNEL, utilizou-se o kit *In Situ Cell Death Detection*, com fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

As centrifugações para as lavagens foram realizadas a 1300xg por 5min. Os espermatozóides foram lavados com PBS-PVP 0,1%, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensão com paraformaldeído e mantido por 1h em temperatura ambiente, para fixação dos espermatozóides. Procedeu-se outra lavagem com PBS-PVP 0,1% e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, permeabilizou-se o material com uma solução composta de 0,5% de Triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio, por 1h em geladeira. Os espermatozóides foram lavados, em PBS-PVP 0,1% e o sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se 15µL do kit (1,5µL da enzima e 13,5µL de tampão) e mantidos na ausência de luz, a 37°C. Foram feitos o controle negativo (somente o tampão) e controle positivo (enzima e tampão e uma solução de 20µL de DNase I (50UI/µL), por 30min em temperatura ambiente. Após este período, os espermatozóides foram lavados com PBS-PVP 0,1% e contra-corados por 30min em temperatura ambiente com 40µL de solução de Hoechst 33342 (1µg/µL) para visualizar o DNA total.

Foram contados pelo menos 100 células de cada amostra em microscópio de fluorescência não invertido. Os espermatozóides foram classificados como TUNEL positivos (com fragmentação do DNA), quando a cabeça apresentava-se na cor verde, e em espermatozóides TUNEL negativos (sem fragmentação do DNA), quando a cabeça do espermatozóide apresentava-se na cor azul, proveniente da coloração com o Hoechst 33342.

O resultado final referiu-se à porcentagem de espermatozóides TUNEL positivos, no qual foi comparado com sêmen controle, que não foi submetido à centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep.

3.3.3 Produção *in vitro* de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)

O controle de qualidade dos espermatozóides submetidos à centrifugação também foi feito pela avaliação da taxa de clivagem e de blastocisto, durante a produção *in vitro* de embriões, utilizando os protocolos desenvolvidos na Área de Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal em projetos anteriores, com modificações descritas nos itens a seguir.

3.3.3.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos coletados em abatedouros foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-35°C e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro, foram aspirados por agulha de 18-gauge acoplada a uma seringa de 20 mL.

O fluido folicular aspirado foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, onde permaneceu na posição vertical por 15 minutos para sedimentação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para uma placa de poliestireno de 60mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Foram selecionados apenas oócitos de *cumulus* compacto com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* e ooplasma de coloração uniforme.

3.3.3.2 Maturação *in vitro*

Os complexos cumulus-oócito (COCs) selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem constituído por meio TCM-199 (GIBCO BRL, Grand Island, EUA), suplementado com 0,2mM de piruvato, 5mM de bicarbonato de sódio, 16,67µg/µL de sulfato de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil) e uma vez em meio de maturação constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25mM de bicarbonato de sódio, 83,4µg/µL de sulfato de amicacina, 1µg/mL de estradiol, 1,0µg/mL de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, EUA), 50µg/mL de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) acrescido de 10% de SFB (Cripion, Andradina, Brasil). Foram transferidas 20 a 25 estruturas/microgota de 100µL.

Os COCs foram maturados durante 22 horas em estufa a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

3.3.3.3 Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 24 horas após o início do cultivo de maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35°C por 30 segundos. Os espermatozóides vivos e móveis do grupo controle foram separados do diluidor por

centrifugação em gradiente de densidade de Percoll (45 e 90%), a 900xg durante 30 minutos. O sedimento recuperado e enriquecido com espermatozóides X foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides vivos por mililitro de meio de fecundação TALP-FIV suplementado com 6mg/mL de BSA, 30 μ g/mL heparina, 18 μ M penicilamina, 10 μ M hipotaurina, 1,8 μ M epinefrina, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4 μ g/mL de amicacina. Aproximadamente 100×10^3 espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100 μ L de meio TALP-FIV designado a cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados três vezes em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 a 25 oócitos por gota de FIV, e incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, umidade saturada.

3.3.3.4 Cultivo *in vitro*

O desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* baseou-se nos protocolos de GUTIÉRREZ-ADÁN et al. (2001, 2004) com modificações descritas por LARSON & KUBISCH (1999), RIZOS et al. (2003), LEYENS et al. (2004), KIMURA et al. (2004). Os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em meio SOF sem adição de SFB e glicose e transferidos para placas com quatro poços contendo 500 μ L do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fecundação. Foram cultivados aproximadamente 65 zigotos por poço e as placas foram mantidas em uma câmara incubadora modular (Billups Rothenberg, Califórnia, EUA) em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, com umidade saturada, no interior de incubadora a 38,5°C.

A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados 44 horas e 7 e 8 dias após a fecundação, respectivamente. Em todas as repetições foi feito, concomitantemente, um grupo controle, que não foi submetido à centrifugação, para obter a proporção sexual real de embriões machos e fêmeas durante o cultivo *in vitro*.

Após a avaliação, os embriões foram lavados em PBS e depositados, individualmente, em microtubos para PCR de 0,2mL contendo 10 μ L de água do Milli-Q autoclavada. Os microtubos, contendo um embrião cada, foram submersos em

nitrogênio líquido, retirados posteriormente e armazenados em freezer até o momento da sexagem pela PCR.

Os dados provenientes da produção *in vitro* de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto) foram submetidos ao teste Qui-quadrado, comparando as raças entre si e os grupos (Percoll, OptiPrep e Controle). Foi considerada significativa uma diferença de $P < 0,05$.

3.4 Validação dos resultados

3.4.1 Predição da proporção espermatozoides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas em gradiente de densidade pela amplificação dos genes *SRY* e *PLP* pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR foi utilizada, no presente estudo, para averiguar a possibilidade de verificação do enriquecimento de amostras com espermatozoides X, após a centrifugação em gradiente de densidade, sem a necessidade de se realizar a validação por meio da produção *in vitro* de embriões e posterior sexagem destes pela PCR convencional.

A estimativa da proporção de espermatozoides X e Y nas amostras de sêmen se baseou no trabalho de PARATI et al. (2006) para a amplificação do gene *SRY*, presente no cromossomo Y (gene “Sex-determining Region Y”, código de acesso no GenBank n° AF148462, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o gene *PLP*, presente no cromossomo X (gene “intron 2 region of the bovine proteolipid protein”, código de acesso no GenBank n° AJ222799, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando para isso a qPCR, empregando-se sondas fluorescentes.

Para o gene *SRY* foi utilizado o seguinte par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”): senso: 5'-CCA CG TCA AGC GAC CCA T-3' e anti-senso: 3'-CGA AGA CGA AAG GTG GCT CT-5' que amplifica uma seqüência de 66pb no DNA. A sonda interna foi: 6FAM-5'-AAC GCC TTC ATT GTG TGG TCT CGT GA-3'-TAMRA. Para o gene *PLP*, o par de “primers” foi: senso: 5'-GTT GTG TTA GTT TCT GCT GTA CAA TAA AGT G-3' e anti-senso: 3'-TCC TAC CCT CAC CTG CCA TC-5' que amplifica uma

seqüência de 96pb no DNA. A sonda interna foi: 6FAM-5'-TGT ATA CAC ATA GCC CCT CCC TCT TGG ACC-3'-TAMRA. As sondas internas TaqMan[®] dos genes *SRY* e *PLP* foram marcadas com o fluoróforo (“reporter”) FAM e “quencher” TAMRA. Os “primers” e as sondas foram sintetizados pela Invitrogen (San Diego, EUA) e Applied Biosystems (Foster City, EUA), respectivamente.

As amplificações foram realizadas, em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Em todas as reações foi utilizado o corante ROX como referência passiva.

As reações foram feitas em triplicata para cada uma das amostras, utilizando-se 12,5µL de 2x Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com 900nM de cada “primer”, 200nM da sonda TaqMan[®], 5µL de DNA, e água do Milli-Q autoclavada, totalizando uma reação de 25µL. A amplificação foi realizada iniciando-se com uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 60 segundos. Para verificação interna da reação foi utilizado um controle negativo, na qual não foi adicionado DNA, um controle com DNA extraído de sangue de macho e com DNA extraído de espermatozoides não submetido à centrifugação nos gradientes de densidade.

Antes de proceder a extração de DNA dos espermatozoides, foram realizadas duas lavagens com PBS, por centrifugação a 900xg por 5 minutos, com o intuito de retirar, o máximo possível, resíduos do gradiente de densidade. A extração de DNA da amostra de sêmen foi realizada utilizando o “DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen, GmbH, Alemanha), com modificações propostas pelo fabricante para extração de espermatozoides de animais. Após a extração do DNA, foi determinada sua concentração (em ng/µL) e pureza (relação entre as densidades óticas de 260/280nm) utilizando-se um biofotômetro (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Antes da realização da qPCR, as amostras foram padronizadas para terem uma concentração final ao redor de 100ng. As amostras com DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização do DNA genômico.

O DNA do controle positivo (macho) foi extraído de sangue de bovinos e a purificação seguiu o protocolo de SAMBROOK et al. (2001). Este DNA de sangue serviu como controle interno da reação.

Os resultados das amplificações das amostras (valores dos Cts) pela qPCR foram analisadas no “Sequence Detection Software” (Applied Biosystems, Foster City, EUA), que acompanha o sistema 7500 de PCR em tempo real, utilizando o ensaio “Relative Quantification (ddCt) Study” presente no próprio “software”. Um exemplo com as curvas de amplificações está representado na Figura 3.

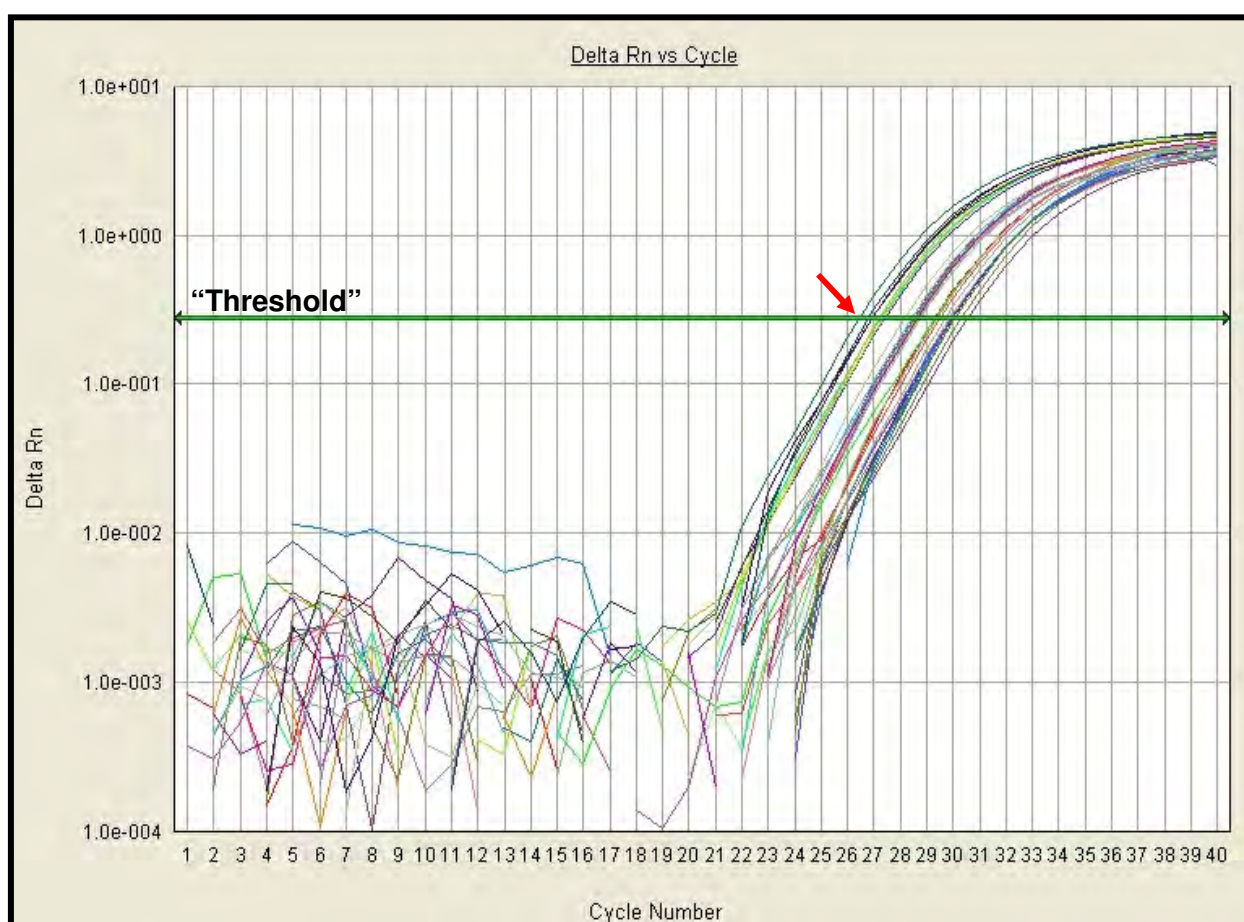


Figura 3. Exemplo de curvas de amplificações (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (*PLP*) e Y (*SRY*) pela PCR em tempo real e a linha de “threshold”. O ciclo do “threshold” (Ct) para cada amostra é o ponto onde a curva de amplificação cruza a linha (indicado pela seta em vermelho).

3.4.2 Verificação do desvio da proporção sexual pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos embriões produzidos *in vitro*

Antes do procedimento de PCR, a cada microtubo contendo um embrião, foram adicionados 5µL de Proteinase K (50µg/embrião) e realizada uma incubação por 60 minutos, a 37°C utilizando um termociclador. Em seguida, a Proteinase K foi desnaturada a 98°C por 10 minutos. O conteúdo de cada tubo foi dividido em duas amostras (A e B) que, em seguida, foram submetidas à PCR.

O sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* foi identificado 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 – senso: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e antisenso: 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3'; "Primer" 2 - senso: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e antisenso: 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'. O "primer" 1 amplifica uma seqüência de 210pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI et al., 1989) e o "primer" 2 amplifica uma seqüência de 196pb em machos (SCHWERIN et al., 1991; LUZ et al., 2000).

Utilizou-se um "primer" específico para o DNA bovino: "Primer" 3 – senso 5' - AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e antisenso: 5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'. Este "primer" amplifica uma seqüência de 280pb, repetida no genoma bovino (ELLIS & HARPOLD, 1986,1988; ELLIS et al., 1988). Os primers 1 e 3 foram utilizados na amostra A e primer 2 foi utilizado na amostra B.

As reações possuíam um volume final de 30µL (23µL do mix mais 7µL de DNA do embrião). O mix da PCR, para cada amostra, continha tampão 10X para PCR, 2mM de MgCl₂, 0,16mM de cada dNTP, 0,17µM de cada primer e 1 unidade de Taq Polimerase (Invitrogen, San Diego, EUA) e água do Milli-Q autoclavada.

As amplificações foram efetuadas em termocicladores MJ Research PTC 100 (GMI Inc., Minnesota, USA) e Genius (Techne, Staffordshire, Reino Unido). As amostras foram submetidas a seguinte seqüência de ciclos: um ciclo inicial de desnaturação do DNA foi feito a 94°C por 4 minutos para as amostras A e B. As amostras A foram submetidas a 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C. As amostras B foram submetidas a 38 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em uma cuba própria, com solução TBE 1X em gel de 2% de agarose, corados com brometo de etídeo (10mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. Os géis foram analisados utilizando-se equipamento de documentação fotográfica STRATAGENE (Eagle Eye® “Software”). Os embriões foram identificados como fêmeas somente quando o produto de 280pb foi visualizado na amostra A e nenhuma outra banda foi visualizada na amostra B correspondente. A presença de duas bandas (280 e 210pb) na amostra A indicou que o embrião era do sexo masculino. Este resultado foi confirmado somente quando uma banda de 196pb foi visualizada na amostra B correspondente. Em todos os géis foram utilizados os controles: DNA de sangue de macho, DNA de sangue de fêmea e um negativo (branco), o qual não foi adicionado DNA. Foi utilizado um padrão (“ladder”) 100pb (Invitrogen, San Diego, EUA) para verificação do tamanho das bandas das amostras.

Os resultados da proporção sexual obtida a partir da identificação do sexo dos embriões nos grupos Percoll, OptiPrep e Controle foram submetidos ao teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

As médias de embriões fêmeas obtidas nos grupos Percoll, OptiPrep e Controle foram comparadas com as médias de espermatozoides X nas amplificações do DNA pela qPCR (item 4.5), utilizando-se a análise de variância, seguido pelo Teste de Tukey, pelo procedimento “General Linear Model” do “software” SAS (Statistical Analysis System). Foi considerada significativa uma diferença de $P < 0,05$.

3.5 Forma de análise dos resultados

3.5.1 Predição da proporção espermatozoides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas em gradiente de densidade de Percoll, OptiPrep e grupo controle (não centrifugado)

O cálculo para predição da proporção de espermatozoides X e Y foi realizado baseando-se no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). O nível de significância para análise estatística dos resultados foi de 5%.

3.5.2 Desvio da proporção sexual dos embriões PIV

Com os dados obtidos pela PCR dos embriões PIV, realizou-se a análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, comparando-se os grupos de centrifugação em gradiente de densidade (Percoll e OptiPrep) e o grupo controle, não submetido à centrifugação. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Centrifugação em gradiente de densidade

Os resultados obtidos com as centrifugações em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep foram agrupados segundo a raça testada. Na Tabela 1 estão contidos as porcentagens médias da motilidade e os valores médios para vigor antes e após o gradiente, e a média das taxas de recuperação de espermatozóides nos gradientes, expressas em porcentagem. A taxa de recuperação foi calculada pela concentração espermática antes e após a centrifugação.

Nas Figuras 5 e 6 estão ilustradas as médias de motilidade obtidas antes e após a centrifugação no gradiente de Percoll e OptiPrep, e a taxa de recuperação de espermatozóides, pelas raças que foram testadas (Gir e Jersey).

A análise destes resultados foi realizada de forma descritiva, ou seja, sem utilização de estatística, devido aos resultados obtidos após a verificação da proporção sexual dos embriões e proporção de espermatozóides X e Y nas amostras centrifugadas nos gradientes de densidade.

Tabela 1. Médias de motilidade e vigor antes e após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep, e média da taxa de recuperação de espermatozóides nas diferentes raças Gir e Jersey.

Grupo	Raça	Motilidade antes (% ± DP)	Vigor antes (1 a 5)	Motilidade depois (%)	Vigor depois (1 a 5)	Taxa de recuperação (% ± DP)
Percoll	Gir	60,0 ± 7,56	3	77,5 ± 10,35	3	4,7 ± 2,10
Percoll	Jersey	67,0 ± 4,83	4	78,0 ± 10,33	4	7,0 ± 7,16
OptiPrep	Gir	60,0 ± 7,56	3	36,2 ± 33,78	3	17,6 ± 4,11
OptiPrep	Jersey	67,0 ± 4,83	4	24,50 ± 17,07	3	21,0 ± 10,34

DP: desvio padrão

Pode-se observar que, anteriormente à centrifugação, a motilidade média foi superior na raça Jersey (67%) do que na Gir (60%). Após a centrifugação, observou-se um aumento de 14% na motilidade no gradiente de Percoll, indicando que houve seleção de espermatozóides viáveis neste gradiente, além da função principal de separar os espermatozóides portadores do cromossomo X. No gradiente de OptiPrep houve uma diminuição de 34% na motilidade após o processo de centrifugação.

Avaliando-se o parâmetro vigor, os resultados indicaram que a variação não foi significativa entre as raças testadas e nos gradientes, antes e após a centrifugação, mantendo-se entre o valor de três e quatro.

No gradiente de Percoll foram recuperados, em média, 2,7 milhões de espermatozóides por tubo. No gradiente de OptiPrep, a média obtida foi de 8,6 milhões de espermatozóides por tubo. A taxa de recuperação média foi de 5,7 e 19,4%, no gradiente de Percoll e OptiPrep, respectivamente. Comparando-se as raças, em relação ao mesmo gradiente, foi observada uma taxa de recuperação de espermatozóides 3% maior na raça Jersey em relação à raça Gir (Figura 6).

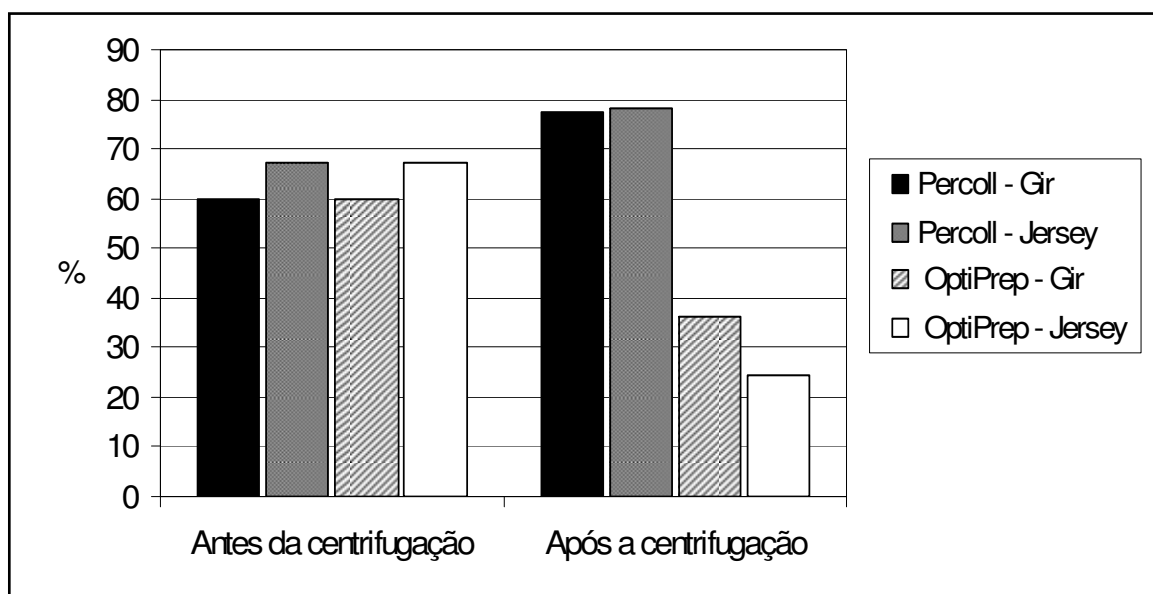


Figura 4. Motilidade antes e após a centrifugação nos gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep nas raças Gir e Jersey.

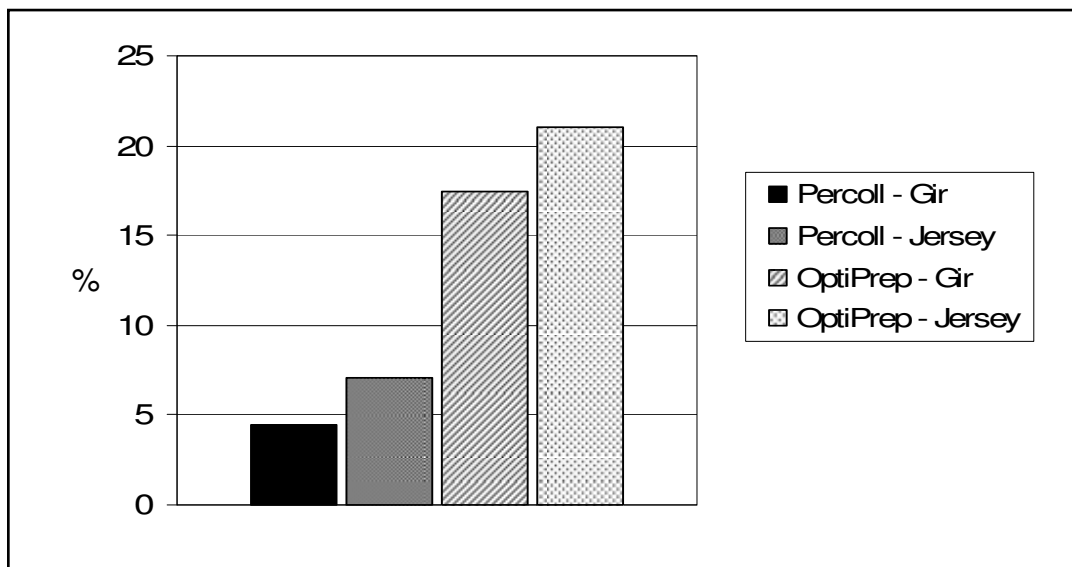


Figura 5. Taxa de recuperação dos espermatozóides após centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep, nas raças Gir e Jersey.

4.2 Avaliação da viabilidade espermática e integridade acrossomal pela coloração com Azul de Tripán/Giemsa

Na Tabela 2 e Figura 7 estão apresentados os resultados das diferenças entre as raças, de acordo com as classes de espermatozóides, indicando a viabilidade espermática (espermatozóide vivo ou morto) e integridade acrossomal (espermatozóides com ou sem acrossoma).

Tabela 2. Classes de espermatozóides, expressas em porcentagens, em relação às raças Gir e Jersey.

Raça	Classes de espermatozóides (%)		
	VI	VSA	Mortos
Gir	21,33 ^b	51,17 ^a	27,50
Jersey	24,92 ^a	45,33 ^b	29,75

Valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

VI: Vivo com acrossoma intacto; VSA: vivo sem acrossoma.

A percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto observada na raça Jersey e Gir foi de 24,9 e 21,3%, respectivamente, o que diferiu significativamente ($P<0,05$).

Na classe de espermatozóides vivos sem acrossoma, houve diferença ($P<0,01$) entre a raça Gir (51,2%), comparada com a raça Jersey (45,3%).

Em relação aos espermatozóides mortos com acrossoma intacto e mortos sem acrossoma, agrupados em uma única classe denominada de mortos, como descrito na metodologia, não foi detectada diferença ($P>0,05$) entre as raças, obtendo-se 27,5 e 29,7% para Gir e Jersey, respectivamente.

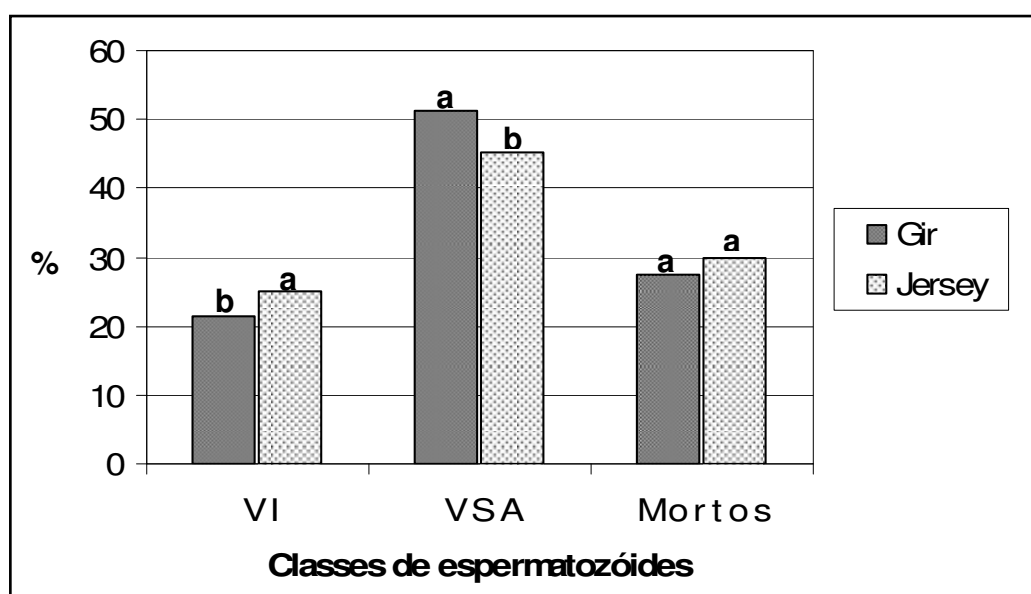


Figura 6: Classes de espermatozóides em relação às raças Gir e Jersey. VI = Vivo com acrossoma intacto; VSA = vivo sem acrossoma. Colunas com letras diferentes diferem entre si ($P<0,05$).

Os dados relativos à comparação entre os gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 8. Comparou-se os gradientes entre si, e com o grupo controle.

Após a análise dos resultados detectou-se decréscimo ($P<0,05$), após a centrifugação, da percentagem de espermatozóides com acrossoma intacto (VI) tanto no Percoll (18,5%), quanto no OptiPrep (21,6%) em comparação com grupo controle

(29,2%). Comparando-se os grupos sexagem entre si, não foi possível detectar nenhuma diferença ($P>0,05$).

Na classe de espermatozoides vivos sem acrossoma, observou-se aumento ($P<0,05$) das porcentagens no grupo Percoll (61,7%) em relação ao grupo controle (41,9%) e ao OptiPrep (41,0%), e não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre o OptiPrep e o grupo controle.

A porcentagem de espermatozoides mortos diferiu entre os três grupos ($P<0,01$), sendo a maior observada no gradiente de OptiPrep (37,38%). Este resultado confirmou os achados de motilidade, avaliada após a centrifugação neste gradiente (Tabela 1), onde apresentou a menor motilidade em comparação com os outros grupos.

Tabela 3. Classes de espermatozoides, expressas em porcentagens, em relação aos gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep e o grupo controle.

Grupo	Classes de espermatozoides (%)		
	VI	VSA	Mortos
Percoll	18,50 ^b	61,75 ^a	19,75 ^c
Optiprep	21,63 ^b	41,00 ^b	37,38 ^a
Controle	29,25 ^a	41,88 ^b	28,88 ^a

Valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

VI: Vivo com acrossoma intacto; VSA: vivo sem acrossoma.

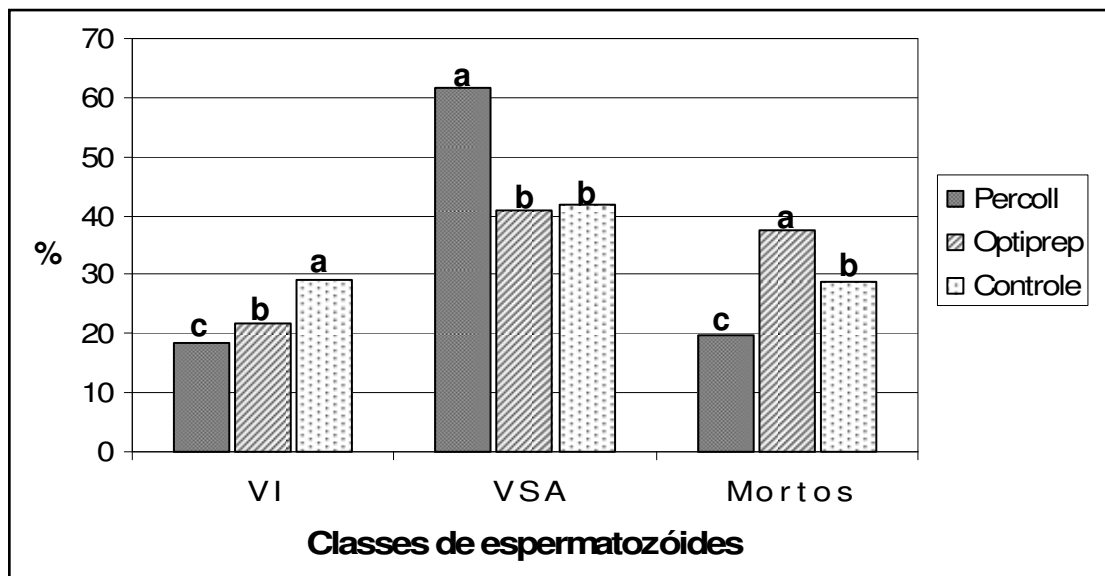


Figura 7: Classes de espermatozoides, expressas em porcentagens, para o grupo Percoll, OptiPrep e Controle. VI = Vivo com acrossoma intacto; VSA = vivo sem acrossoma. Colunas com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$).

4.3 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozoides

Não foram observadas fragmentações de DNA pela técnica de TUNEL, tanto nas amostras submetidas à centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep, bem como nas amostras do grupo controle (não submetida à centrifugação), nas condições em que a técnica foi executada. Pode-se inferir a não existência de fragmentação de DNA nos espermatozoides utilizados, ou que a fragmentação seja reduzida, não sendo capaz de ser detectada pela técnica.

A fragmentação de DNA foi detectada somente no controle positivo da técnica, onde, propositadamente, induziu-se a quebra de DNA pela adição de DNase, para verificar a funcionalidade do kit utilizado.

Um exemplo como espermatozoides eram visibilizados durante a execução da técnica está representado na Figura 8.

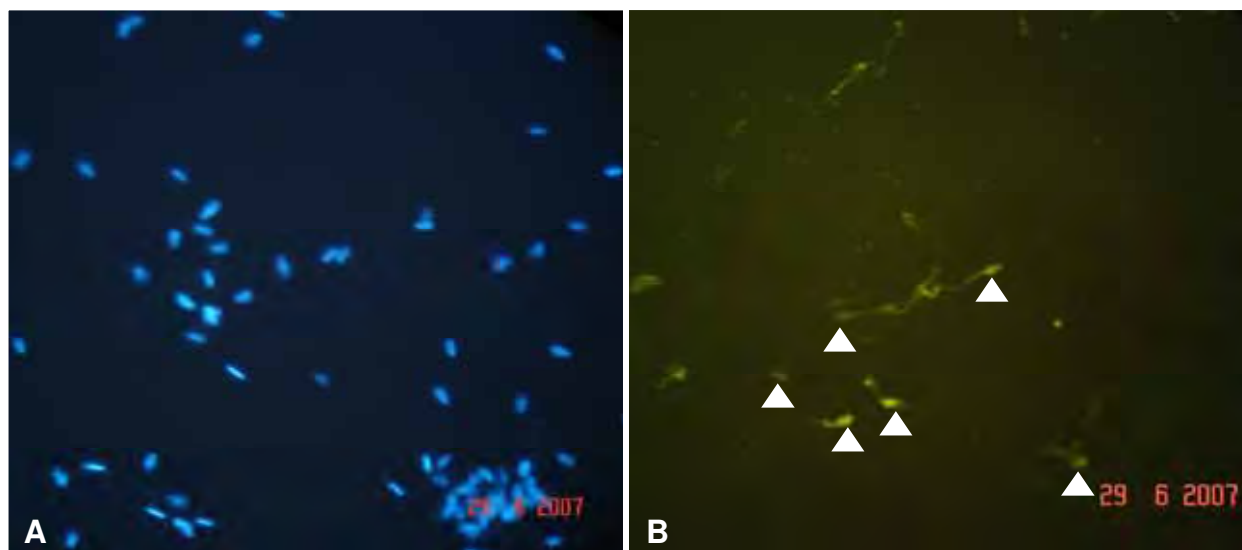


Figura 8. Espermatozoides submetidos à técnica de TUNEL para verificação de fragmentação de DNA, sob microscopia de fluorescência. **A:** espermatozoides sem fragmentação de DNA. **B:** espermatozoides do controle positivo (adição de DNase) apresentando fragmentação de DNA, indicados pelas cabeças de seta. Fotografia digital com aumento de 1000X.

4.4 Produção *in vitro* de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)

Foram utilizados 3.451 oócitos para os três grupos (Percoll, OptiPrep e Controle), obtendo-se 772 blastocistos. Os dados da produção *in vitro* de embriões proveniente dos espermatozoides submetidos à centrifugação em gradiente de Percoll e OptiPrep e o grupo controle (não centrifugado) estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 de acordo com a raça e o grupo.

Após análise pelo teste de Qui-quadrado comparando os grupos (Percoll, OptiPrep e Controle), como observado na Tabela 4, não foi detectada diferença ($P > 0,05$) na taxa de clivagem, na qual ficou ao redor 70%. A taxa de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) no gradiente de Percoll (20,64%) em relação ao gradiente de OptiPrep (21,48%) e grupo Controle (25,3%).

Não foi encontrada diferença ($P>0,05$) nas taxas de clivagem e de blastocisto após o agrupamento dos resultados da raça Gir e Jersey, sem considerar os grupos (Percoll, OptiPrep e Controle).

Tabela 4. Número de oócitos, taxa de clivagem e de blastocisto durante a PIV de embriões bovinos utilizando espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e o grupo controle (não centrifugado).

Grupo	Número de oócitos	Taxa de clivagem n (% ± DP)	Taxa de blastocistos n (% ± DP)
Percoll	1.182	817 (69,12 ± 9,65)	244 (20,64 ± 8,92) ^b
OptiPrep	1.150	802 (69,74 ± 9,62)	247 (21,48 ± 10,21) ^a
Controle	1.119	801 (71,58 ± 7,51)	271 (25,30 ± 7,46) ^a
Total	3.451	-	-

DP: desvio padrão; valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

Tabela 5. Agrupamento dos resultados provenientes do número de oócitos, taxa de clivagem e de blastocisto durante a PIV de embriões bovinos em relação às raças Gir e Jersey.

Raça	Número de oócitos	Taxa de clivagem n (% ± DP)	Taxa de blastocistos n (% ± DP)
Gir	1.921	1.345 (70,02 ± 8,22)	445 (23,17 ± 6,06)
Jersey	1.530	1.075 (70,26 ± 9,64)	327 (21,37 ± 6,48)
Total	3.451	-	-

DP: desvio padrão; não houve diferença estatística ($P>0,05$).

4.5 Identificação do sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* pela PCR

Foram utilizados 772 embriões para a identificação do sexo genético pela PCR, e destes 706 (91,45%) puderam ser sexados. Desta forma, foram realizados 1.544 procedimentos de PCR (em 1.412 foi possível a visibilização das bandas), pois cada um dos embriões era dividido em duas amostras.

Os resultados obtidos com a sexagem dos embriões produzidos *in vitro* estão apresentados na Tabela 7. Um exemplo de um gel contendo as amplificações referentes à sexagem de embriões está ilustrado na Figura 9.

Após a análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, observou-se que o gradiente de Percoll separou os espermatozóides X, ocorrendo desvio da proporção sexual ($P < 0,05$), obtendo-se 62% de embriões fêmeas, em comparação com 48% de embriões fêmeas no grupo controle. No gradiente de OptiPrep a porcentagem de fêmeas foi de 47,3%, o que não diferiu ($P > 0,05$) do grupo controle.

Tabela 6. Proporção sexual obtida com embriões produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e do grupo controle.

Grupo	Total de embriões	Embriões machos n (% ± DP)	Embriões fêmeas n (% ± DP)
Percoll	221	84 (38,0 ± 3,02) ^b	137 (62,0 ± 3,02) ^a
OptiPrep	239	126 (52,7 ± 6,28) ^a	113 (47,3 ± 6,28) ^b
Controle	246	128 (52,0 ± 5,04) ^a	118 (48,0 ± 5,04) ^b
Total	706	-	-

DP: desvio padrão; valores seguidos de letras diferentes nas colunas diferem entre si (P<0,05).

Os dados provenientes da proporção sexual obtida no gradiente de Percoll e OptiPrep e o no grupo controle, comparando-se as raças estão apresentados na Tabela 8. Não houve diferença (P>0,05) na porcentagem de fêmeas obtidas analisando-se as raças entre si, quando analisou-se cada um dos grupos.

Tabela 7. Proporção sexual obtida com embriões produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep e do grupo controle de acordo com a raça utilizada.

Raça	Grupo	Número de embriões	Embriões machos n (% ± DP)	Embriões fêmeas n (% ± DP)
Gir	Percoll	139	53 (38,1 ± 3,88) ^b	86 (61,9 ± 3,88) ^a
	OptiPrep	101	73 (52,9 ± 0,32) ^a	65 (47,1 ± 0,32) ^b
	Controle	141	71 (50,4 ± 5,09) ^a	70 (49,6 ± 5,09) ^b
Jersey	Percoll	82	31 (37,8 ± 2,00) ^b	51 (62,2 ± 2,00) ^a
	OptiPrep	138	53 (52,5 ± 7,07) ^a	48 (47,5 ± 7,07) ^b
	Controle	105	57 (54,3 ± 4,35) ^a	48 (45,7 ± 4,35) ^b
Total	-	706	-	-

DP: desvio padrão; valores seguidos de letras diferentes nas colunas diferem entre si (P<0,05).

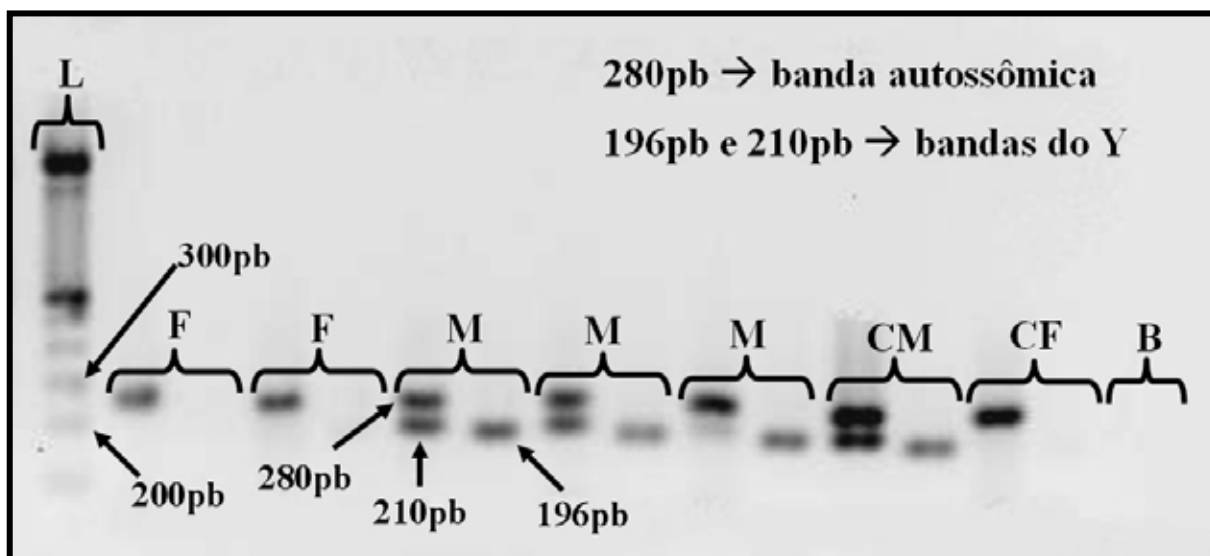


Figura 9. Representação de um gel de agarose a 2% com os padrões de amplificação pela PCR de DNA de embriões bovinos produzidos *in vitro* corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos com 280pb, 210pb e 196pb. Legenda: L (“ladder”: 100pb, Invitrogen, San Diego, EUA), F (embrião fêmea), M (embrião macho), CM (controle com DNA de macho), CF (controle com DNA de fêmea) e B (branco – sem DNA).

4.6 Predição da proporção espermatozoides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas pela qPCR

Os dados provenientes das amostras submetidas à qPCR foram agrupados na Tabela 8.

Realizando-se a quantificação relativa dos cromossomos X e Y para amostras de DNA extraído de sangue (controle da técnica), obteve-se uma porcentagem média de 50,3% para cada um dos cromossomos. Para as amostras contendo DNA de espermatozoides não submetidos à centrifugação, obteve-se uma média de 50,1% demonstrando que a técnica foi capaz de identificar corretamente a proporção de cromossomos X e Y, já que a proporção esperada desses cromossomos, no sexo masculino é de 1:1.

Para as amostras submetidas à sexagem em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep, obteve-se uma porcentagem de cromossomos X igual a 52,2 e 47,2%, respectivamente. Verificou-se, após a análise estatística, que apesar de haver uma pequena tendência no Percoll de aumento da porcentagem de cromossomos X, este valor ficou aquém do obtido na PCR dos embriões (62% de fêmeas), diferindo entre si ($P < 0,05$). No entanto, no OptiPrep, o valor obtido na qPCR não diferiu ($P > 0,05$) em relação a PCR dos embriões (47,3% de embriões fêmeas), da mesma maneira como ocorreu no grupo Controle (Tabela 9).

Tabela 8. Valores médios de eficiência de amplificação para os genes *PLP* e *SRY* e porcentagem de cromossomos X e Y em amostras, submetidas à qPCR, contendo DNA de sangue e de espermatozoides submetidos e não submetidos à centrifugação.

Grupo	Eficiência da reação X (<i>PLP</i>)	Eficiência da reação Y (<i>SRY</i>)	Cromossomos X % \pm DP	Cromossomos Y % \pm DP
Controle com DNA de sangue de macho	1,99	1,99	50,3 \pm 0,6	49,7 \pm 0,6
Espermatozoides não centrifugados (controle)	2,00	2,00	50,1 \pm 1,1	49,9 \pm 1,1
Percoll	2,00	2,00	52,2 \pm 2,3	47,8 \pm 2,3
OpriPrep	2,00	2,00	47,2 \pm 2,4	52,8 \pm 2,4

DP: desvio padrão

Após análise das amplificações do DNA de sangue de bovino do sexo masculino (controle) e das amostras de DNA dos espermatozoides dos grupos Percoll, OptiPrep e Controle verificou-se que a eficiência média foi próxima de 100% para os dois genes utilizados (*PLP* e *SRY*), com uma correlação (R^2) média de 0,996.

Na Tabela 9, estão contidos os dados de comparação entre a PCR dos embriões e a qPCR do DNA dos espermatozoides submetidos a centrifugação, bem como o grupo controle.

Tabela 9. Porcentagem de embriões fêmeas obtidas pela PCR dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, e a porcentagem de cromossomos X obtidos do DNA de espermatozoides pela qPCR nos grupos Percoll, OptiPrep e Controle.

Grupo	Embriões fêmeas na PCR % ± DP	Cromossomos X na qPCR % ± DP
Percoll	62,0 ± 3,02 ^a	52,2 ± 2,3 ^b
OptiPrep	47,3 ± 6,28 ^a	47,2 ± 2,4 ^a
Controle	48,0 ± 5,04 ^a	50,1 ± 1,1 ^a

DP: desvio padrão; valores seguidos de letras diferentes nas linhas diferem entre si (P<0,05)

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep na tentativa de separar espermatozóides portadores do cromossomo X e utilizá-los diretamente na fecundação *in vitro* de embriões. Além disso, os espermatozóides foram submetidos a um controle de qualidade, realizando-se coloração para verificação da viabilidade e integridade do acrossoma, verificação da fragmentação do DNA, taxa de clivagem e de blastocisto. Verificou-se a acuidade da técnica de sexagem por centrifugação em gradiente de densidade pela PCR dos embriões produzidos *in vitro* e pela proporção de espermatozóides X e Y, obtida diretamente das amostras centrifugadas, utilizando-se a qPCR.

5.1 Centrifugação em gradiente de densidade e proporção sexual

A taxa de recuperação dos espermatozóides, após a centrifugação, obtida no gradiente de Percoll foi de 5,7%, resultados semelhantes obtidos por (LUCIO, 2007), onde esta taxa atingiu 4,6%. Utilizando espermatozóides recém-colhidos HOSSEPIAN DE LIMA (2005), obteve uma taxa de 12%, em média. A origem dos espermatozóides utilizados pode justificar um menor índice de recuperação, pois o processo de congelamento e descongelamento provoca alterações físicas nestes espermatozóides (HAUGAN et al., 2007), o que poderia influenciar o seu comportamento frente ao processo de centrifugação em gradiente de densidade.

Observamos diminuição da motilidade após a centrifugação, no gradiente de OptiPrep, o que não ocorreu com Percoll. Esses achados são semelhantes aos trabalhos realizados em humanos (MOUSSET-SIMEON et al., 2004) e em bovinos (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005), que observaram menor motilidade, após centrifugação no gradiente OptiPrep, em relação ao gradiente de Percoll. Resultados diferentes foram

obtidos em espermatozóides humanos (ANDERSEN & GRINSTED, 1997; HARRISON, 1997; CLAASSENS, 1998), onde não observaram diferenças entre OptiPrep e outras substâncias formadoras de gradiente como o Percoll.

A respeito do OptiPrep, este tem sido utilizado na medicina humana para separação de espermatozóides viáveis e com motilidade, como substituto do Percoll, que teve seu uso suspenso nas clínicas humanas desde 1996 devido a uma possível contaminação por endotoxinas (McCANN & CHANTLER, 2000) e por provocar endometrite nas mulheres (MAKKAR et al., 1999).

Neste trabalho demonstramos que utilizando gradiente de densidade de Percoll foi possível separar espermatozóides X dos Y, fato este confirmado pelo desvio da proporção sexual dos embriões produzidos *in vitro*. A porcentagem de embriões fêmeas, após a verificação do sexo genético pela PCR, demonstrou que o Percoll alcançou uma média de 62%, comparando-se com o grupo controle (47% embriões fêmeas). O gradiente de densidade de OptiPrep não obteve o mesmo sucesso (47% de embriões fêmeas).

Em nosso estudo, montamos gradientes de densidade com apenas três camadas e foram armazenados. Este procedimento facilitará a utilização destes gradientes em empresas especializadas de congelação e comercialização de sêmen ou em empresas de produção *in vitro* de embriões, já que não haveria a necessidade de preparo destes gradientes no mesmo dia de utilização, facilitando os procedimentos de rotina nestas empresas. Contrariamente, os gradientes descontínuos, sejam eles compostos por poucas ou muitas camadas, devem ser utilizados pouco tempo antes do procedimento de centrifugação, pois, caso contrário, ocorre a mistura das camadas descaracterizando o gradiente.

Resultados de sexagem de espermatozóides bovinos recém-colhidos, com o uso de gradiente descontínuo de Percoll contendo 12 camadas, foram descritos na literatura obtendo seleção de espermatozóides X de 55,7% (KOBAYASHI et al., 2004) a 74,3% (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000). Em humanos, também utilizando gradiente descontínuo de Percoll com 12 camadas, os resultados variaram de 55% (WANG et al., 1994) a 94% (IIZUKA et al., 1987) de enriquecimento com espermatozóides X, após a centrifugação.

Os nossos resultados, quanto ao desvio da proporção sexual para fêmeas alcançaram 62%, o que foi superior aos obtidos quando se utilizou gradiente de densidade descontínuo de Percoll composto por três camadas, também utilizando espermatozóides descongelados (LUCIO, 2007). Neste trabalho foi obtida uma porcentagem de 59,5% de fêmeas, como uma motilidade pós-centrifugação similar à encontrada no nosso trabalho, ao redor de 80%. KOBAYASHI e colaboradores (2004) utilizaram espermatozóides descongelados diretamente no gradiente descontínuo de Percoll, verificando não haver seleção de espermatozóides X após a centrifugação, fato este não confirmado por nossos resultados, utilizando gradiente de densidade, e com os achados de LUCIO (2007), que utilizou gradiente descontínuo. No entanto, não houve relato de utilização dos espermatozóides para fecundação *in vitro*.

Também utilizando espermatozóides bovinos descongelados, HOSSEPIAN DE LIMA (1998) realizou centrifugação em gradiente de densidade descontínuo de Percoll, obtendo uma acuidade de 75% na seleção de espermatozóides X, confirmado pela coloração com quinacrina mustarda, onde o corpúsculo-F foi corado.

O corpúsculo-F representa a região distal do braço longo do cromossomo Y, e que pode ser visto como um ponto fluorescente na coloração com quinacrina em, aproximadamente 40% dos espermatozóides Y em humanos (BARLOW & VOSA, 1970; Van KOOIJ & Van OOST, 1992). Apesar do corpúsculo F representar o cromossomo Y igualmente em bovinos, assim como em humanos (BLOTTNER et al., 1992a), a metodologia de validação baseada nesta técnica apresenta desvantagens que podem comprometer a avaliação final.

Dentre estas desvantagens podemos citar a existência de alto desvio padrão da técnica de coloração, podendo alcançar 16,4% (ISHIJIMA et al., 1991; BLOTTNER et al., 1992b), influência da centrifugação em meios que contenham o Percoll ou albumina, podendo ocorrer uma coloração inespecífica de cromossomos autossômicos ao invés de serem corados somente o cromossomo Y (Van KOOIJ & Van OOST, 1992; CHECK et al., 2000). Devido a estes fatos, atualmente, são utilizadas sondas de DNA para avaliação da porcentagem de espermatozóides X e Y em uma amostra, como o FISH (KOBAYASHI et al., 2004), ou técnicas que amplificam seqüências específicas do cromossomo X e Y (PARATI et al., 2006, PUGLISI et al., 2006).

Não foi possível verificar diferenças entre as raças em relação à proporção sexual, mesmo existindo diferença na quantidade de DNA entre os espermatozóides X e Y entre taurinos e zebuínos (JOHNSON, 1994; GARNER, 2006), representados neste trabalho pela raça Jersey e Gir, respectivamente. HOSSEPIAN DE LIMA (2005), também assinalou, em seu trabalho, a impossibilidade da técnica de centrifugação nos gradientes de densidade de diferir entre as raças.

A utilização do OptiPrep com o objetivo de sexagem de espermatozóides recém-colhidos foi descrito pela primeira vez por HOSSEPIAN DE LIMA (2005), com resultados de até 80% de separação de espermatozóides X. Os nossos resultados, utilizando espermatozóides descongelados, indicaram que o OptiPrep não foi efetivo para a separação de espermatozóides X, não ocorrendo desvio em relação ao grupo controle.

LUCIO (2007) verificou que um desvio da proporção sexual de 60%, mantendo-se uma taxa de prenhez por volta de 75%, que foi alcançado no trabalho de HOSSEPIAN DE LIMA (2005) utilizando espermatozóides sexados por gradiente de densidade, é possível aumentar a intensidade de seleção, e, conseqüentemente, o ganho genético, e, além disso, diminuir a taxa de reposição de fêmeas no rebanho.

Em trabalhos que utilizaram espermatozóides sexados por citometria de fluxo, a taxa de reposição permaneceu a mesma ou aumentou, mantendo ou reduzindo a intensidade de seleção, e nunca se elevando. Esse fato pode ser explicado, pois o método de sexagem por citometria de fluxo reduz a eficiência reprodutiva, o que pode ser comprovado pelas baixas taxas de prenhez (revisto no item 2.2.2, a). No entanto, o método de sexagem por centrifugação em gradiente de densidade não altera a eficiência reprodutiva do rebanho, comparando-se com a utilização do sêmen convencional na inseminação artificial (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

5.2 Avaliação da viabilidade espermática e integridade acrossomal pela coloração com Azul de Tripan/Giemsa

A coloração Azul de Tripan/Giemsa tem sido utilizada como um indicativo para avaliação da qualidade do sêmen, devido à sua habilidade de diferenciar espermatozóides vivos e mortos e ainda fornecer a condição acrossomal (PARRISH et

al., 1988; KOVACS & FOOTE, 1992; COSTA, 2002; KÚTVÖLGYI et al., 2006). Por outro lado, o fato que o processo de congelação e descongelação causar danos a membrana e perda do acrossoma (WATSON, 2000), os resultados da coloração demonstraram uma diferença entre os gradientes de Percoll e OptiPrep em comparação com o grupo controle, em relação aos espermatozóides vivos com acrossoma intacto.

Os espermatozóides vivos com acrossoma intacto são os únicos potencialmente aptos ao processo de fecundação (PARRISH et al., 1988; HOSSEPIAN DE LIMA, 2005), e em nossos achados houve diminuição da porcentagem destes espermatozóides após a centrifugação nos gradientes de densidade de Percoll (18,5%) e OptiPrep (21,63%), comparando-se com o grupo controle, que não foi submetido à centrifugação (29,25%). Esta diminuição de espermatozóides vivos com acrossoma intacto em amostras submetidas à centrifugação em gradiente de densidade, também foi relatada em estudos anteriores, tanto em humanos (McCANN & CHANTLER, 2000), como em bovinos (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005; LUCIO, 2007). Resultados contraditórios a estes trabalhos foram encontrados por SLOTTE et al. (1993), trabalhando com espermatozóides humanos, onde o Percoll inibiu a reação acrossomal.

No entanto, para a produção *in vitro* de embriões, os espermatozóides vivos sem acrossoma (VSA), encontrada em maior porcentagem no gradiente de Percoll e OptiPrep, também é capaz de fecundar desde que não demande muito tempo entre o final do processo de centrifugação e fecundação *in vitro* (JOHNSON, 2000).

Apesar da diminuição de espermatozóides vivos com acrossoma intacto após a centrifugação, denotando haver reação acrossomal durante o processo, não houve diferenças na taxa de clivagem entre os gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep e o grupo controle. Apenas na taxa de blastocisto da raça Jersey, houve uma diminuição da porcentagem em relação ao grupo controle. O fato de ter ocorrido diminuição na taxa de blastocisto apenas na raça Jersey, será discutido no item 5.4. Podemos inferir com estes resultados, que a participação dos espermatozóides VSA no processo de fecundação não pode ser descartado, assim como assinalado por JOHNSON (2000).

5.3 Verificação da fragmentação do DNA dos espermatozóides

Diversas técnicas para verificar a fragmentação de DNA têm sido utilizadas, rotineiramente, tanto em humanos (BENCHAIB et al., 2003; LARSON-COOK et al., 2003), em bovinos (BALLACHEY et al., 1988; MARTIN et al., 2004; MARTINS et al., 2007a,b) e em suínos (DE AMBROGI et al., 2006), para avaliar a viabilidade espermática, e conseqüentemente, a qualidade dos espermatozóides que se deseja utilizar.

Taxas de fragmentação do DNA maiores ou iguais a 30% estão correlacionadas a baixas porcentagens de gestação em humanos (BENCHAIB et al., 2003; EVENSON & WIXON, 2006), além disso, em bovinos, provocam diminuição da fertilidade do sêmen a campo (WATERHOUSE et al., 2006), bem como influência durante a produção *in vitro* de embriões (FATEHI et al., 2006). Devido à sua importância, a verificação de danos ao DNA torna-se necessária, principalmente quando se propõe utilizar técnicas que promovem a manipulação dos espermatozóides.

Apesar de existirem relatos na literatura na identificação da fragmentação do DNA com a técnica do TUNEL em espermatozóides bovinos (FATEHI et al., 2006; MARTINS et al., 2007a,b), não foi possível, em nosso estudo, a identificação de espermatozóides TUNEL-positivos. Podemos supor que a técnica não foi suficientemente sensível para detectar pequenas fragmentações do DNA dos espermatozóides submetidos ao processo de congelamento/descongelamento e posterior centrifugação, ou ainda, a inexistência de fragmentação do DNA. Esta última hipótese fica comprometida, pela comprovação da existência de fragmentação de DNA em espermatozóides bovinos descongelados, porém em uma porcentagem muito baixa, cerca de 1% (MARTINS et al., 2007b), e uma média de 7% em espermatozóides submetidos à liofilização (MARTINS et al., 2007a), que é considerada baixa e é devida a grande condensação do DNA nas células espermáticas, favorecendo a sua proteção.

Apesar da técnica do TUNEL ser promissora, alguns autores vêm criticando-a devido a grande variedade na execução da metodologia (EVENSON & WIXON, 2006). Em nosso estudo, executamos esta metodologia conforme indicação de um trabalho publicado recentemente (MARTINS et al., 2007a), podendo não ter existido todas as

condições necessárias para sua execução, o que poderia justificar diferentes resultados encontrados no presente trabalho.

5.4 Produção *in vitro* de embriões (taxa de clivagem e de blastocisto)

Ficou demonstrado, de maneira geral, que a centrifugação nos gradientes de densidade não interferiu na produção *in vitro* de embriões.

Os resultados de taxa de clivagem não diferiu entre o grupo centrifugado (Percoll e OptiPrep) que variou de 68 a 70%, e no controle de 70 a 73%, indicando que não houve interferência da centrifugação neste parâmetro avaliado. Estes resultados ficaram ligeiramente abaixo dos obtidos por HOSSEPIAN DE LIMA (2005), conseguindo ao redor de 76% de taxa de clivagem. Contudo, neste trabalho observou-se que o processo de centrifugação diminuiu a taxa de clivagem em relação ao grupo não centrifugado.

A única diferença, com menor taxa de blastocisto, ocorreu no gradiente de Percoll, na raça Jersey. Este fato foi devido à influência de um dos touros utilizados, que obteve uma taxa de blastocisto de 11%, comparado a uma média de 23% dos outros três touros (dados não publicados). Diferentemente, em trabalhos anteriores (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998, 2005; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000) obteve-se uma média 30% de taxa de blastocisto.

Salientamos, ainda, que os espermatozóides utilizados no presente trabalho passaram por processo de congelamento/descongelamento e, após isto, foram submetidos à centrifugação nos gradiente de densidade. Metodologia diferente ao utilizado pela maioria dos trabalhos encontrados na literatura, que realizaram a centrifugação de espermatozóides recém-colhidos. Apesar da facilidade de difusão do material genético dos touros pela criopreservação do sêmen, este procedimento ainda incorre em efeitos negativos aos espermatozóides, como alterações de membrana, anormalidades da cromatina e integridade de DNA, perda de proteínas necessárias à fecundação (HAUGAN et al., 2007) e ainda induz um mecanismo semelhante à apoptose (MARTIN et al., 2004). Devido a isto, resultados inferiores são esperados quando se utiliza

espermatozóides provenientes de criopreservação, em comparação quando com espermatozóides recém-colhidos.

Mesmo assim, a taxa de blastocisto obtidas em nosso estudo (20,6% no Percoll e 21,6% no OptiPrep), foram superiores aos relatados na literatura, utilizando espermatozóides sexados pela citometria de fluxo. Obteve-se 16% de blastocisto quando se utilizou espermatozóides apenas sexados e não criopreservados (LU et al., 1999), e 12% quando os espermatozóides utilizados foram criopreservados após a sexagem (WILSON et al., 2006).

Neste estudo, a proporção de embriões macho:fêmea obtida no grupo controle, foi próxima à proporção teórica esperada de 50:50. Deste modo, é possível a produção *in vitro* de embriões sem desvio da proporção sexual para machos com a utilização de meio diferenciado, isto é, sem adição de glicose (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004), soro fetal bovino (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; RIZOS et al., 2003; AGUNG et al., 2005), e atmosfera com tensão de oxigênio de 5% (RHEINGANTZ et al., 2004; KIMURA et al., 2004).

Esta diminuição da tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro*, pode ter reduzido a produção de radicais livres e, conseqüentemente, o favorecimento dos embriões machos. Os embriões fêmeas possuem um mecanismo mais eficiente de controle dos radicais livres, atribuído aos genes G6PD (glicose-6-fosfato-desidrogenase) e HPRT (hipoxantina fosforilbosisil transferase) presentes no cromossomo X (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000). A expressão desses dois genes está duplicada, nos embriões fêmeas, antes da ocorrência da inativação de um dos cromossomos X (PEIPPO et al., 2002; RHEINGANTZ et al., 2004).

Este favorecimento dos embriões machos, durante a produção *in vitro*, é um fato bem descrito na literatura já algum tempo (AVERY et al., 1989, 1991, 1992; BREDBACKA & BREDBACKA, 1996), porém, ainda encontra-se na literatura, a utilização de meios de cultivos ou ambiente *in vitro* que favorecem um dos sexos. Ainda há relatos que durante a produção *in vitro* ocorre alteração da expressão genética ligada ao sexo (PEIPPO et al., 2002), acabando por favorecer um sexo em detrimento do outro, e, geralmente, os embriões fêmeas são os prejudicados.

5.6 Predição da proporção espermatozóides X e Y em amostras de sêmen centrifugadas pela qPCR

A qPCR vem sendo utilizada, recentemente, como uma técnica confiável para a quantificação de espermatozóides X e Y em amostras de sêmen, principalmente para validação de técnicas de sexagem de espermatozóides (JOERG et al. 2004; PARATI et al., 2006; PUGLISI et al., 2006).

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, a utilização da qPCR para a validação da sexagem de espermatozóides bovinos submetidos à centrifugação em gradiente de densidade. Além disso, foi possível a quantificação da proporção de espermatozóides X e Y em amostras de sêmen submetidas à centrifugação sem a necessidade de ajuste pela utilização de uma regressão linear, como a utilizada em outros trabalhos (PARATI et al., 2006; PUGLISI et al., 2006).

Os resultados da predição da proporção de espermatozóides X e Y pela qPCR confirmaram os achados da identificação genética do sexo em embriões bovinos produzidos *in vitro* com a utilização de espermatozóides sexados e não sexados, no grupo OptiPrep e no controle. No gradiente de Percoll, a porcentagem de cromossomos X nas amostras encontradas pela qPCR (52%) ficaram subestimados em relação à proporção sexual obtida na PCR dos embriões (62%). Este fato pode ter ocorrido devido a presença dos componentes do Percoll, como a sílica e o PVP, que podem ter interferido no processo de extração do DNA ou durante as amplificações na qPCR, mesmo sendo feitas lavagens sucessivas. Houve relatos que o Percoll, em uma concentração de 80%, foi responsável por uma grande variabilidade durante a sexagem pela citometria de fluxo (STAP et al., 1998; PUGLISI et al., 2006). Em nosso estudo, os espermatozóides foram recuperados em uma fração contendo 90% de Percoll, o que, teoricamente, poderia ter influenciado os resultados obtidos na qPCR, similarmente como ocorreu na sexagem pela citometria de fluxo. Além disso, ainda não foi descrito na literatura, a interferência do Percoll nos processos de extração de DNA e na qPCR.

Em um estudo complementar (dados não publicados) utilizamos doses de sêmen com espermatozóides sexados para X pela técnica de citometria de fluxo. A porcentagem obtida de cromossomos X, utilizando a qPCR, foi de 89%, que ficou

dentro da expectativa de 85 a 95% obtida pela citometria de fluxo (SEIDEL & GARNER, 2002; CRAN, 2007; HAMANO, 2007).

Nossos resultados, em estimar a porcentagem de cromossomos X e Y em amostras de sêmen com espermatozoides sexados pela citometria, foram superiores aos obtidos no trabalho de JOERG e colaboradores (2004). Neste trabalho houve uma subestimação tanto na porcentagem de espermatozoides portadores do cromossomo X e quanto do Y, obtendo um máximo de 80 e 70%, respectivamente, onde a porcentagem esperada é de 85 a 95% (SEIDEL & GARNER, 2002).

6. CONCLUSÕES

- A) A utilização de gradientes de densidade facilitou os procedimentos de sexagem, pois não houve a necessidade de montagem destes no mesmo dia de utilização;
- B) O processo de centrifugação não prejudicou a taxa de clivagem e de blastocisto, apesar da diminuição na porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto, verificando que esta classe de espermatozóides não é um fator determinante no processo.
- C) Não foi detectada fragmentação do DNA dos espermatozóides centrifugados no gradiente de densidade de Percoll e Optiprep;
- D) O gradiente de densidade de Percoll foi eficiente para a seleção de espermatozóides X provenientes de sêmen descongelado, enquanto que, o gradiente de OptiPrep não obteve o mesmo sucesso;
- E) Os espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade de Percoll e OptiPrep foram utilizados diretamente para a fecundação *in vitro* sem a necessidade de procedimentos de lavagem;
- F) A PCR quantitativa em tempo real do DNA extraído dos espermatozóides centrifugados nos gradientes de densidade confirmou os dados obtidos com a sexagem pela PCR dos embriões produzidos *in vitro* no gradiente de OptiPrep e no grupo controle, porém subestimou os valores do gradiente de Percoll;

- G) Com desvio da proporção sexual para fêmeas de 62%, obtido no gradiente de Percoll, é possível aumentar intensidade de seleção e diminuir a taxa de reposição, o que não ocorre em técnicas que apresentam maior acuidade de seleção de espermatozoides (90%), devido aos danos provocados aos espermatozoides.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIM, G.; SCHNELL, S. Genetic impacts of using female-sorted semen in commercial and nucleus herds. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 1554–1563, 2007.
- AGUNG, B.; OTOI, T.; ABE, H.; HOSHI, H.; MURAKAMI, M.; KARJA, N.W.; MURAKAMI, M.K.; WONGSRIKEAO, P.; WATARI, H.; SUZUKI, T. Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 40, n. 1, p. 51-56, 2005.
- AGUNG, B.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, R.; WATARI, H.; NAGAI, T. Effect of culture maturation period of oocytes on the sex ratio of in vitro fertilized bovine embryos. **J. Reprod. Dev.**, v. 52, n. 1, p. 123-127, 2006.
- 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.
- AMANN, R. P. Treatment of sperm to determine sex. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 4961, 1989.
- ANDERSEN, C. Y.; GRINSTED, J. A new method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: polysucrose media compared to Percoll media. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 14, p. 624-628, 1997.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 41, n. 2, p. 95-97, 2006.
- ASTOLFI, P.; CUCCIA, M.; MARTINETTI, M. Paternal HLA genotype and offspring sex ratio. **Hum. Biol.**, v. 73, n. 2, p. 315-319, 2001.
- AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, 1991.
- AVERY, B.; SCHIMDT, M.; GREVE, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. **Acta Vet. Scand.**, v. 30, p. 147-153, 1989.
- AVERY, B.; JORGENSEN, C. B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 32, n. 3, p. 265-270, 1992
- BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R. G. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **J. Androl.**, v. 9, p. 109-115, 1998.
- BARLOW, P.; VOSA, C. G. The Y chromosome in human spermatozoa. **Nature**, v. 226, p. 961-962, 1970.

BEKMAN, H.; MEUWISSEN, T .H. E.; OLDENBROEK, J. K. Increasing beef production from dairy cows by implanting embryos from MOET nucleus breeding schemes for beef cattle. **Livest. Prod. Sci.**, v. 37. p. 271-82, 1994.

BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUÉRIN, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Hum. Reprod.**, v. 18, n. 5, p.1023-1028, 2003.

BERGER, T.; MARR, R. P.; MOYER, D. L. Comparison of techniques for selection of motility spermatozoa. **Fertil. Sterility**, v. 43, p. 258, 1985.

BLOTTNER, S.; SCHWERIN, M.; PITRA, C.; REINSCH, A.; JEWGENOW, K. Fluorescence body of bovine spermatozoa represents Y-chromosome. **Andrologia**, v. 24, n. 4, p. 237-238, 1992a.

BLOTTNER, S.; PITRA, C.; BERGER, U. Y-chromosome-specific fluorescence (f-body) of poorly decondensed bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 24, n. 5, p. 255-259, 1992b.

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.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, n. 2, p. 169-172, 1996.

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.

CHECK, M. L.; BOLLENDORF, A.; CHECK, J. H.; HOURANI, W.; LONG, R.; MCMONAGLE, K. Separation of sperm through a 12-layer percoll column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. **Arch. Androl.**, v. 44, n. 1, p. 47-50, 2000.

CLAASSENS, O. E.; MENKVELD, R.; HARRISON, K. L. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 3139-3143, 1998.

COSTA, M. Z. **Utilização da indução da reação acrossomal e taxa de clivagem in vitro como parâmetros para estimar a fertilidade de touros nelore doadores de sêmen.** 2002, 72f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

CRAN, D. G. XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 65, p. 475-491, 2007.

DE AMBROGI, M.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, n.8, p.1994-2000, 2006.

DEMATAWEWA, C. M. B.; BERGER, P. J. Break-even cost of cloning in genetic improvement of dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 81, n. 4, p. 1136-1147, 1998.

DENSITY GRADIENT MEDIA. **Applications and products**. 5 ed. Axis-Shield: Norway, 2005, p. 15-18.

DIDION, B. A.; DOBRINSKY, J. R.; GILES, J. R.; GRAVES, C. N. Staining procedure to detect viability and the truea cromosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Res.**, v. 22, p. 51-57, 1989.

DUARTE, A. M.; DINIZ, E. G.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; TAVARES, M.; FRANCO, R. V. R. Pregnancy rates in heifers inseminated with semen of nelore bulls sexed by flow cytometry. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 567-573, 2007.

EHMAN, K. D.; SCOTT, M. E. Female mice mate preferentially with non parasitized males. **Parasitology**, v. 125, p. 461-466, 2002.

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.

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

ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. (1988): **Nucleic acid probes for prenatal sexing**. U.S. Patent No. 4,769,319.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J. Androl.**, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

FERRAZ, L. D. **Estudo clínico do efeito do momento da cópula em relação à ovulação nas taxas de concepção e prenhez, proporção sexual e morte embrionária precoce na raça Puro Sangue Inglês**. 2005, 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

FOUNTAIN, E. D.; MAO, J.; WHYTE, J. J.; MUELLER, K. E.; ELLERSIECK, M. R.; WILL, M. J.; ROBERTS, R. M.; MACDONALD, R.; ROSENFELD, C. S. Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice. **Biol. Reprod.**, 2007, doi:10.1095/biolreprod.107.065003. Em impressão.

FORD, T.; GRAHAM, J.; RICKWOOD, D. Iodixanol: A nonionic isoosmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. **Anal. Biochem.**, v. 220, p. 360, 1994.

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

- GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.
- GORDON, I. Sex Control by Sperm Separation. In: _____. **Laboratory production of Cattle Embryos**. United Kingdom: CAB International, 1994. p. 339-407.
- GRAHAM, J.; FORD, T.; RICKWOOD, D. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of Iodixanol. **Anal. Biochem.**, v. 220, p. 367, 1994.
- GUTIERREZ-ADAN, A.; OTER, M.; MARTINEZ-MADRID, B.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, n. 2, p. 146-151, 2000.
- 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.
- GUTIERREZ-ADAN, 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. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2004.
- HABERMANN, F. A.; WINTER, A.; OLSAKER, I.; REICHERT, P.; FRIES, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual color fluorescence in situ hybridization. **J. Anim. Breed. Genet.**, Suppl. 1, p. 22-27, 2005.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Cromossomos X e Y: espermatozoides transportadores. In: _____. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 395-398.
- HAMANO, K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. **J. Reprod. Dev.**, v. 53, n. 1, p.27-38, 2007.
- HARRISON, K. L. Iodixanol as a density gradient medium for the isolation of motile spermatozoa. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 14, p. 385-387, 1997.
- HAUGAN, T; GRÖHN, Y. T.; KOMMISRUUD, E.; ROPSTAD, E.; REKSEN, O. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 97, n. 1-2, 2007.
- HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1421-1433, 1999.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, suplemento especial, p. 219-228, 2007.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. **Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 1998. 89f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; RAMALHO, M. D. T.; RODRIGUES, L. H.; MALHEIROS, E. B.; MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-Bearing Bovine Spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 280, 2000.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Controle de qualidade na seleção de espermatozoides de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica coloidal modificada (Percoll®) e iodixanol (Optiprep™)**. 2005, 214f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

IIZUKA, R.; KANEKO, S.; AOKI, R.; KOBAYASHI, T. Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. **Hum. Reprod.**, v. 2, p. 573-575, 1987.

ISHIJIMA, S.A.; OKUNO, M.; MOHRI, H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. **Int. J. Androl.**, v. 14, n. 5, p. 340-347, 1991.

IWATA H.; SHIONO H.; KON Y.; MATSUBARA K.; KIMURA K.; KUWAYAMA T.; MONJI Y. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, 7 Mar, 2007. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.006. Em impressão.

JAFAR, S. I.; FLINT, A. P. F. Sex selection in mammals: a review. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 191-200, 1996.

JAMES, W. H. Analysing data on the sex ratio of human births by cycle day of conception. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 5, p. 1206-1208, 2000

JAMES, W. H. Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) is a compound used in the baking industry and in the manufacture of chocolate. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, n. 2-3, p. 268-269, 1999.

JAMES, W. H. The hypothesized hormonal control of mammalian Sex ratio at birth - A second update. **J. Theor. Biol.**, v. 155, p. 121-128, 1992.

JOERG, H.; ASAI, M.; GRAPHODATSKAYA, D.; JANETT, F.; STRANZINGER, G. Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 121, p. 209–215, 2004.

JOHNSON, L. A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxf. Rev. Reprod. Biol.**, v. 16, p. 303-326, 1994.

JOHNSON, L. A. Sex preselection by flow cytometry separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, n. 4, p. 893-903, 1995.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60, p. 93-107, 2000.

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.

KANEKO, S.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertil. Steril.**, v. 40, n. 5, p. 661-665, 1983.

- KIMURA K.; IWATA, H.; THOMPSON, J. G. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Animal Reproduction Science* (2006), doi:10.1016/j.anireprosci.2006.12.014. Em impressão.
- 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. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 68, n. 1, p. 88-95, 2004.
- KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. **J. Reprod. Dev.**, v. 50, p. 463-469, 2004.
- KOVACS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotech. Histochem.**, v. 67, n. 3, p. 119-124, 1992.
- KÚTVÖLGYI, G.; STEFLER, J.; KOVÁCS, A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. **Biotech. Histochem.**, v. 81, p. 109-117, 2006.
- LARSON, M. A.; KUBISCH, H. M. The effects of group size on development and interferon-tau secretion by in-vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 8, p. 2075-2079, 1999.
- LARSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J.D.; HANSEN, K.A.; KASPERSON, K.M.; AAMOLD, E.T.; EVENSON, D. P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertil Steril.**, v. 80, n. 4, p. 895-902, 2003.
- LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 69, n. 3, p. 243-251, 2004.
- LIBBUS, B. L.; PERREAULT, S. D.; JOHNSON, L. A.; PINKEL, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoescht 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. **Mutat. Res.**, v. 182, p. 265-274, 1987.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL Jr., G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, 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, 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- 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. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, p. 453-456, 2000.
- MAKKAR, G.; NG, H. Y.; YEUNG, S. B.; HO, P.C. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. **Fertil. Steril.**, v. 72, n. 5, p. 796-802, 1999.

- MARTIN G, SABIDO O, DURAND P, LEVY. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol. Reprod.**, v. 71, n.1, p. 28-37, 2004.
- MARTINEZ, F.; KAABI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; ANEL, E. BOIXO, J. C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. **Theriogenology**, v. 62, p. 1264–1270, 2004.
- MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, v. 67, p. 1307–1315, 2007a.
- MARTINS, C. F.; DODE, M. N.; BÁO, S. N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, n. 1, p. 94-104, 2007b.
- McCANN, C. T.; CHANTLER, E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **Int. J. Androl.**, v. 23, p. 205-209, 2000.
- MOLES, A.; RIZZI, R.; DÁMATO, F. R. The number of males pups within a litter of NMRI mice is associated with the dams food preferences late in pregnancy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, p. 250-60, 2003.
- 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 Fertilisation In Vitro Using Flow-Cytometrically Sex-Sorted Sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 931-940, 2007.
- MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, n. 2, p. 319, 1979 (Abstract).
- MOUSSET-SIMÉON, N.; RIVES, N.; MASSE, L.; CHEVALLIER, F.; MACE, B. Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. **J. Androl**, v. 25, p. 1-4, 2004.
- MURI, A. H. **Administração de ácido ascórbico por via oral em cadelas em estro para aumentar a proporção de nascimentos de fêmeas em relação aos machos**. 2004, 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- NICHOLAS, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 205-14, 1996.
- PARATI, K.; BONGIONI, G.; ALEANDRI, R.; GALLI, A. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. **Theriogenology**, v. 66, p. 2202-2209, 2006.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PEIPPO, J.; FARAZMAND, A.; KURKILAHTI, M.; MARKKULA, M.; BASRUR, P. K.; KING, W.A. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 8, n. 10, p. 923-929, 2002.

PUGLISI, R.; VANNI, R.; GALLI, A.; BALDUZZI, D.; PARATI, K.; BONGIONI, G.; CROTTI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; ALEANDRI, R. In vitro fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p.519-526, 2006.

PURSLEY, J. R.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2139–2144, 1998.

REUBINOFF, B. E.; SCHENKER, J. G. New advances in sex preselection. **Fertil. Steril.**, v. 66, n. 3, p. 343-350, 1996.

RHEINGANTZ, M. G. T.; PEGORARO, L. M. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; PIMENTEL, A. M.; BERNARDI, M. L.; DESCHAMPS, J. C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por Swim-up ou Gradiente de Percoll. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, p. 32-39, 2004.

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. **Biol. Reprod.**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

ROELOFS, J. B.; BOUWMANA, E. B.; PEDERSEN, H. G.; RIESTRA RASMUSSEN, Z.; SOEDE, N. M.; THOMSEN, P. D.; KEMP, B. Effect of time of artificial insemination on embryo sex ratio in dairy cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 93, p. 366–371, 2006.

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

ROSENFELD, C. S.; GRIMM, K.; LIVINGSTON, K. A.; BROKMAN, A. M.; LAMBERSON, W. E.; ROBERTS, R. M. Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 8, p. 4628-4632, 2003.

RUVUNA, F.; TAYLOR, J. F.; WALTER, J. P.; TURNER, J. W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 70, n. 4, p. 1091-1097, 1992.

RYAN, B. C.; VANDENBERGH, J. G. Intrauterine position effects. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 665-678, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, 2001.

SAS. Institute, SAS (Statistical analyses system) User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002.

SCHWERIN, M.; BLOTTNER, S.; THOMSEN, P. D.; ROSCHLAU, D.; BROCKMANN, G. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 30, n. 1, p. 39-43, 1991.

- SEIDEL Jr., G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z.; GREEN, R.D.; CRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-1420, 1999.
- SEIDEL Jr., G. E. Economics of selecting for sex: the most important genetic tract. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-598, 2003b.
- SEIDEL Jr., G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443-446, 2007.
- SEIDEL Jr., G. E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology, and biology. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 79, n. 3-4, p. 145-156, 2003a.
- SEIDEL Jr., G. E.; ALLEN, C. H.; JOHNSON, L. A.; HOLLAND, M. D.; BRINK, Z.; WELCH, G. R.; GRAHAM, J. K.; CATTELL, M. B. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 1255-1264, 1997.
- SEIDEL Jr., G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 733-743, 2002.
- SHASTRY, P. R.; HEGDE, U. C.; RAO, S. S. Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. **Nature**, v. 269, p. 58-60, 1977.
- SLOTTE, H.; AKERLÖF, E.; POUSETTE, A. Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll inhibits, the acrosome reaction. **Int. J. Androl.**, v. 16, n. 6, p. 349-354, 1993.
- SOEDE, N. M.; NISSEN, A. K.; KEMP, B. Timing of insemination relative to ovulation in pigs: effects on sex ratio of offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 1003-1011, 2000.
- SPINACI, M.; De AMBROGI, M.; VOLPE, S.; GALEATI, G.; TAMANINI, C.; SEREN, E. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. **Theriogenology**, v. 64, p. 191-201, 2005.
- STAP, J.; HOEBE, R. A.; MERTON, J. S.; HARING, R. M.; BAKKER, P. J. M.; ATEN, J. A. Improving the resolution of cryopreserved X- and Y-sperm during DNA flow cytometric analysis with the addition of Percoll to quench the fluorescence of dead sperm. **J. Anim. Sci.**, v. 76, n. 7, p. 1896-1902, 1998.
- TAYLOR, St., C. S.; MOORE, A. J.; THIESSEN, R. B.; BAILEY, C. M. Food efficiency in traditional and sex controlled systems of beef production. **Anim. Prod.**, v. 40, p. 401-440, 1985.
- Van KOOIJ, R. J.; Van OOST, B. A. Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. **Fertil Steril.**, v. 58, n. 2, p. 384-386, 1992.
- Van VLECK, L. D. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In: BRACKETT, B. G., SEIDEL, G. E., SEIDEL, S. M. (Ed.). **New technologies in animal breeding**. Academic Press, 1981, p.221-242.
- Van VLECK, L.D., JOHN POLLAK, E., BRANDFORD OLTENACU, E.A. **Genetics for the animal science**. New York: W.H. Freeman, cap.13, p.287-313, 1987.

VICENT, R.; NADEAU, D. Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles. **Anal. Biochem.**, v. 141, p. 322-328, 1984.

WANG, H. X.; FLAHERTY, S. P.; SWANN, N. J.; MATTHEWS, C. D. Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 1265-1270, 1994.

WATERHOUSE, K. E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D. P.; De ANGELIS, P. M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18, n. 7, p. 781-788, 2006.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WEIGEL, K. A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **J. Dairy Sci.**, v. 87 (E. Suppl.), p. E120-E130, 2004.

WILSON, R. D.; FRICKE, P. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; RUTLEDGE, J. J.; PENFIELD, C.M.; WEIGEL, K. A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 6. p. 1007-1015, 2006.

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

ZUCCOTTI, M.; SEBASTIANO, V.; GARAGNA, S.; REDI, C. A. Experimental demonstration that mammalian oocytes are not selective towards X- or Y-bearing sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 71, n.2, p. 245-246, 2005.