

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

CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E DA PRODUÇÃO  
EMBRIONÁRIA DE ESPERMATOZÓIDES SEXADOS POR  
CITOMETRIA DE FLUXO OU POR GRADIENTE DE DENSIDADE

**William Jardim de Oliveira Santos**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E DA PRODUÇÃO  
EMBRIONÁRIA DE ESPERMATOZÓIDES SEXADOS POR  
CITOMETRIA DE FLUXO OU POR GRADIENTE DE DENSIDADE**

**William Jardim de Oliveira Santos**

**Médico Veterinário**

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

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).**

**JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL**

**Março de 2014**

Santos, William Jardim de Oliveira  
S237c      Caracterização do transcriptoma e da produção embrionária de  
espermatozoides sexados por citometria de fluxo ou gradiente de  
densidade / William Jardim de Oliveira Santos. -- Jaboticabal, 2012  
xii, 55 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima  
Banca examinadora: Beatriz da Costa Aguiar Alves Reis, Lindsay  
Unno Gimenes  
Bibliografia

1. Bovino. 2. Espermatozoide. 3. Seleção do Sexo. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

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

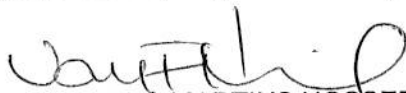
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA E DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE ERPERMATOZOÍDES SEXADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO OU POR GRADIENTE DE DENSIDADE

**AUTOR:** WILLIAM JARDIM DE OLIVEIRA SANTOS

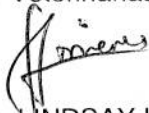
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. BEATRIZ DA COSTA AGUIAR ALVES REIS

Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Data da realização: 17 de março de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**William Jardim de Oliveira Santos** - nascido em 20 de Fevereiro de 1986, na cidade de Ribeirão Preto-SP, onde concluiu o Ensino Médio em Dezembro de 2004. Ingressou em Março de 2005 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia - MG. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia - MG em Março de 2010, iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, SP em Março de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos docentes, funcionários e amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

À FAPESP pela bolsa de estudo

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

Aos membros das bancas de Exame de Qualificação e de Defesa de Dissertação pelas correções para publicação da versão final desse trabalho

À Professora Vera Hossepian de Lima pela orientação

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                   | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                                                                                           | iv   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                                                                           | vii  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                                                                                                      | ix   |
| <b>RESUMO</b>                                                                                                                     | xii  |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                                                                   | xii  |
| <br>                                                                                                                              |      |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                              | 1    |
| <br>                                                                                                                              |      |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                                                   | 2    |
| 2.1. Utilização da técnica de sexagem de espermatozoides na inseminação artificial (IA) e na produção in vitro de embriões (PIVE) | 2    |
| 2.2. Citometria de fluxo                                                                                                          | 4    |
| 2.3. Centrifugação em gradiente de densidade                                                                                      | 7    |
| 2.4. Genoma paterno e desenvolvimento embrionário                                                                                 | 9    |
| 2.5. Análise do transcriptoma dos espermatozoides bovinos.                                                                        | 12   |
| 2.5.1. Análise do transcriptoma bovino por microarranjo de DNA                                                                    | 12   |
| 2.5.2. Análise do transcriptoma bovino por sequenciamento de RNA (RNA-seq)                                                        | 15   |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.2.1. Biblioteca de RNA Poli(A)                            | 15        |
| 2.5.2.1. Biblioteca de RNA Poli(A)15                          |           |
| 2.5.2.2. Os benefícios da tecnologia do sequenciamento de RNA | 16        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                           | <b>19</b> |

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                      | <b>20</b> |
| 4.1. Obtenção dos espermatozoides, embriões e delineamento experimental                           | 20        |
| 4.2. Separação de espermatozoides móveis para caracterizar expressão gênica em transcriptoma      | 20        |
| 4.2.1. Grupo controle                                                                             | 20        |
| 4.2.2. Grupo gradiente de sexagem                                                                 | 21        |
| 4.2.2.1. Preparação dos gradientes de densidade                                                   | 21        |
| 4.2.2.2. Centrifugação e recuperação dos espermatozoides nos gradientes de sexagem                | 22        |
| 4.2.3. Grupo citometria de fluxo                                                                  | 24        |
| 4.3. Extração de RNA total de espermatozoides para caracterizar expressão gênica em transcriptoma | 25        |
| 4.3.1. Quantificação do RNA total extraído                                                        | 25        |
| 4.3.2. Transcrição reversa                                                                        | 25        |
| 4.3.3. Controle da contaminação por DNA genômico                                                  | 26        |
| 4.3.4. Preparo de biblioteca de cDNA e sequenciamento                                             | 26        |
| 4.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões                                                         | 27        |
| 4.4.1. Obtenção e seleção dos oócitos                                                             | 27        |
| 4.4.2. Maturação <i>in vitro</i>                                                                  | 28        |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.3. Fecundação <i>in vitro</i>                             | 29        |
| 4.4.4. Desenvolvimento <i>in vitro</i>                        | 30        |
| 4.3. Forma de análise dos resultados                          | 31        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                              | <b>32</b> |
| 5.1. Análise do transcriptoma de espermatozóides por RNA-seq. |           |
| 5.1.1. Extração do RNA total                                  | 32        |
| 5.1.2. Controle da contaminação por gDNA de leucócitos        | 33        |
| 5.1.3. Preparo da biblioteca de cDNA                          | 36        |
| 5.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões                     | 38        |
| <b>7. CONCLUSÕES</b>                                          | <b>42</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b>                                         | <b>44</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Quantificação do RNA total pelo NanoDrop das amostras de sêmen de touros submetidos a diferentes tratamentos.       | 33 |
| <b>Tabela 2.</b> Taxas de clivagem e produção total de Blastocistos e Blastocistos Expandidos <i>in vitro</i> em quatro tratamentos. | 39 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gradiente de densidade de Percol (45%/90%). Amostra de sêmen convencional descongelado depositada sobre gradiente (A). Sedimento de espermazóides móveis de bovinos, utilizado para a extração de RNA ou para a Produção *in vitro* de embriões (B). Unesp, Campus de Jaboticabal 21
- Figura 2.** Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção de gradiente descontínuo de densidade. Unesp, Campus de Jaboticabal 22
- Figura 3.** Representação da etapa de centrifugação refrigerada de rotor horizontal (A e B); recuperação dos espermatozoides por um sistema á vácuo (C); recuperação do sedimento (D). Unesp, Campus de Jaboticabal. 23
- Figura 4.** Representação do sêmen bovino depositado sobre o mini gradiente descontínuo de densidade de Percoll<sup>TM</sup> 45% e 90%. Unesp, Campus de Jaboticabal. 24
- Figura 5.** Aspiração de ovários de matadouro. Unesp, Campus de Jaboticabal. 27
- Figura 6.** Representação dos Oócitos bovinos classificados como grau 1 (A); grau 2 (B); grau 3 (C); selecionados pós-aspiração para serem maturados *in vitro*. 28

**Figura 7.** Oócitos bovinos maturados *in vitro* após aspiração de folículos de ovários provenientes de abatedouro. Unesp, Campus de Jaboticabal.

29

**Figura 8.** Representação da placa para fecundação *in vitro* (A); Blastocistos expandidos produzidos *in vitro* (B). Unesp, Campus de Jaboticabal.

31

**Figura 9.** Perfil de amplificação de CD4 (a) e CD45 (b) em cDNA construído a partir de RNA espermático

**Figura 10.** qPCR. a) curva de amplificação de protamina em amostras de cDNA espermático; b) um único pico de melting para protamina descarta a possibilidade de contaminação das amostras de RNA por gDNA.

34

**Figura 11:** Validação por PCR em tempo real das bibliotecas de cDNA produzido a partir de RNA espermático. (a) padrão do fabricante; (b) PC = sêmen convencional; (c) PS = sêmen sexado pelo citômetro de fluxo; (d) PG = sêmen sexado pelo gradiente de densidade.

35

37

## LISTA DE ABREVIATURAS

**μ** - micro  
**μg** - micrograma  
**μL** - microlitro  
**μM** - micromolar  
**AA** – ácido aracdônico  
**AKR1B1** – aldo-keto redutase familia B1 tipo 1  
**ANOVA** – análise de variância  
**BAX** – “BCL2 associated X protein”  
**BSA** – albumina sérica bovina  
**cDNA** – DNA complementar  
**COC** – complexo *cumulus* - oócito  
**COX 1** – ciclooxigenase tipo 1 ou “prostaglandin G/H synthase type 1”  
**COX 2** – ciclooxigenase tipo 2 ou “prostaglandin G/H synthase type 2”  
**CQ** – ciclo de quantificação  
**DMEM** – “Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium”  
**DNA** – ácido desoxirribonucleico  
**dNTP** - desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
  
**DNTMA3** – “DNA metiltransferase 3\_”  
**Fg** - femtograma  
  
**FIV** – fecundação *in vitro*  
**FSH** – hormônio folículo estimulante  
**G14** – Gradiente 14  
**G6PD** – glicose-6-fosfato-desidrogenase  
**gDNA** – DNA genômico  
**GAPDH** - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
**GLUT 1** – “glucose transporter type 1”  
**GPX 1** – glutationa peroxidase tipo 1  
**GSMT 3** – “glutathione – S – tranferase Um type 3”  
**H2AFZ** – histona H2Az  
**hCG** – gonadotrofina coriônica humana  
**HEPES** – N(2-Hydroxethyl)piperazine –N`(ethanesulfonic acid)  
**HSP** – “heat shock protein”  
**IA** – Inseminação Artificial  
**IGF** - “insulin-like growth factor”  
**IGF2R** – “insulin-like growth factor 2 receptor”  
**min** – minutos  
**mL** - mililitro  
**mm** – milimetrtro  
**mM** – milimolar  
**MnSOD** – manganês superóxido dismutase

**MOTE** – múltiplas ovulações e transferência de embriões  
**mRNA** – RNA mensageiro  
**ng** – nanograma  
**pb** – pares de bases  
**PCR** – reação em cadeia da polimerase  
**PG** – prostaglandina  
**PGES<sup>2</sup>** - prostaglandina  
**PGRMC1** – receptor de membrana de progesterona tipo 1  
**PGRMC2** – receptor de membrana de progesterona tipo 2  
**pH** - potencial Hidrogeniônico  
**PIVE** – Produção *in vitro de embriões*  
**PLAC8** – “placenta specific type 8”  
**pmol** - picomol  
**qPCR** – PCR quantitativa em tempo real  
**RNA** – ácido ribonucléico  
**ROS** – espécies reativas de oxigênio  
**SCL2A1** – “solute carrier family 2 (facilitate glucose transporter) member 1”  
**SE** – solução estoque  
**SFB** – soro fetal bovino  
**SOF** – fluído sintético de oviduto  
**TALP** – “tyrode`s albumin – lactate – pyruvate”  
**TCM** – Meio para cultivo de tecidos  
**TNF- $\alpha$**  – tumor necrosis factor alpha  
**TP53** – proteína tumoral p53  
**xg** – vezes a gravidade  
  
**XIST** – “X (inactive)-specific transcript”

samen st



## CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE ESPERMATOZOIDES SEXADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO OU POR GRADIENTE DE DENSIDADE

### RESUMO

Os procedimentos durante a sexagem pelo citômetro de fluxo garantem a acuidade de 85%, mas causam danos na viabilidade espermática que levam a baixa taxa de prenhez após os 90 dias. Os objetivos dessa Dissertação foram: 1) caracterizar a expressão gênica diferencial em transcriptoma de espermatozoides congelados pelo método convencional, sexados por centrifugação em gradiente de densidade ou sexados por citometria de fluxo; 2) comparar as taxas de clivagem e de blastocistos produzidos *in vitro* de bovinos utilizando sêmen convencional, sexado por citometria de fluxo ou por centrifugação em gradiente de densidade. Os grupos experimentais para sêmen e embriões foram: 1) grupo controle: sêmen convencional submetido ao gradiente de Percoll™ 45/90% e respectivos embriões produzidos com esse sêmen; 2) grupo gradiente: centrifugação em gradiente de densidade e respectivos embriões produzidos com esse sêmen; 3) grupo citometria: sêmen sexado pelo citômetro de fluxo, submetido ao mini gradiente de Percoll™ 45/90% e respectivos embriões produzidos com esse sêmen. O RNA total foi extraído dos espermatozoides ( $20 \times 10^6$  células) obtendo-se 400 ng RNA/  $20 \times 10^6$  células/ animal, ou seja, 20 fg RNA por espermatozoide. Entretanto, não foi possível a construção da biblioteca de cDNA, provavelmente, devido ao alto grau de degradação do RNA. Os Complexos *cumulus* oócito (COCs) classificados como graus 1, foram aspirados de folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro a partir de ovários de abatedouros e maturados durante 18 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Os oócitos maturados serão colocados em contato com os espermatozoides previamente preparados para fecundação e incubados por 20 horas em 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 38,5°C. Os prováveis zigotos serão lavados por três vezes em meio SOF (meio sintético de fluido de oviduto) sem SFB e sem glicose e cultivados e transferidos para placas com quatro poços contendo 500 µL do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a

fecundação. O desenvolvimento embrionário foi avaliado 7-8 dias após a fecundação. As taxas de clivagem e de blastocistos foram 10 por cento menores e estatisticamente diferentes no tratamento em que se utilizou espermatozoides sexados pela citometria de fluxo.

**Palavras chave:** bovino, espermatozoide, seleção do sexo, transcriptoma

## CHARACTERIZATION OF TRANSCRIPTOME FROM SEXED SPERMATOZOA BY FLOW CYTOMETRIC OR DENSITY GRADIENT

**SUMMARY** - The procedures for sexing by flow cytometry guarantee the accuracy of 85%, but cause damage in sperm viability leading to lower pregnancy rate after 90 days of pregnancy. The objectives of this study were: 1) to characterize differential gene expression in transcriptome of spermatozoa frozen by conventional method, sexed by density gradient centrifugation, by flow cytometry. 2) Compare blastocyst and cleavage rates produced *in vitro* by conventional semen sexed by flow cytometry and by density gradient centrifugation. The experimental groups for semen and embryos were: 1) control group: conventional semen subjected to Percoll™ gradient of 45/90% and their embryos produced with this semen, 2) gradient group: centrifugation in density gradient and their embryos produced with this semen, 3) cytometry group: semen sexed by flow cytometer, subjected to Percoll™ mini gradient 45/90% and their embryos produced with this semen. Total RNA was extracted from sperm ( $20 \times 10^6$  cells) and it was possible to extract 400 ngRNA/  $20 \times 10^6$  cells/animal or it means, 20 fg of RNA per spermatozoa. However cDNA libraries were not built, probably due a high RNA degradation. The cumulus oocyte complexes (COCs) were classified as grade 1, aspirated from antral follicles with 3-8 mm in diameter, ovaries from slaughterhouse were used and matured for 18 hours in an incubator at 38.5°C, 100% humidity and atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> in air. The matured oocytes are going to be placed in contact with the prepared spermatozoa for fertilization and incubated for 20 hours in 5% CO<sub>2</sub> at a temperature of 38.5 °C. Presumptive zygotes are going to be washed three times in SOF (half synthetic oviduct fluid) without FBS and without glucose, cultivated and transferred to plates with four wells containing 500 ul of the same medium used for washing zygotes after fertilization. Embryonic development was evaluated 7-8 days after fertilization. The cleavage and blastocyst rates were 10 percent smaller and statistically different in the treatment which was used sexed sperm by flow cytometry.

**Keywords:** bovine, spermatozoa, sex selection, transcriptome

## 1. INTRODUÇÃO

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

Apesar do seu amplo uso, a PIVE possui algumas limitações, como por exemplo, o sistema de cultivo *in vitro* que favorece o desenvolvimento de maior número de embriões do sexo masculino (GUTIÉRREZ-ÁDAN et al., 2001; 2004). Devido a este fato, métodos para separar populações de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y são utilizados. A técnica de sexagem de espermatozoides, disponível comercialmente, é a citometria de fluxo, com média de 85% de acuidade, mas com relatos de diminuição da viabilidade espermática. Esse processo de sexagem pode ser responsável por variações nas taxas de clivagem (0 a 89%), de blastocistos (3,5 a 38,8%) e contribuindo para perdas de 32% na taxa de prenhez após os 60 dias de gestação (BODMER et al., 2005; PALMA et al., 2008; UNDERWOOD et al., 2010).

Os embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria de fluxo apresentam alta proporção de mitocôndrias imaturas e membranas nucleares danificadas (PALMA et al., 2008) e reduzida expressão dos genes importantes para o desenvolvimento embrionário (MORTON et al., 2007; BERMEJO-ÁLVAREZ, et al., 2010, LUCIO, 2011). A quantificação relativa de mRNA de vários genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (FARIN et al., 2004; DODE et al., 2006) e quando este padrão de expressão é alterado, pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário e à ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in vitro* estejam desprovidos do potencial para sustentarem a prenhez (WRENZYCKI et al., 2005).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

A técnica de produção *in vitro* de embriões, apresenta algumas limitações de seu uso como o sistema de cultivo que desvia a proporção dos sexos para o masculino (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; 2004).

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

Como em outros países, a produção, a venda e a utilização de doses de sêmen sexado pela técnica disponível comercialmente (citometria de fluxo) está aquém da demanda do Brasil (ASBIA, 2009). A venda entre 2006 e 2009 foi de 500 mil doses e a produção atual é cerca de 10 mil doses por mês (<http://www.crvlagoa.com.br/semensexado.asp?orig=3&id=84> em março de 2014) o que representa cerca de 120 mil doses por ano. Vale lembrar que o Brasil comercializa um milhão de doses de sêmen convencional por mês (12 milhões por ano, ASBIA, 2012). O custo elevado da dose do sêmen sexado devido ao alto custo de aquisição e manutenção do citômetro de fluxo, bem como tributos impostos pela legislação de

patentes (WEIGEL, 2004; De VRIES et al., 2008) pode ser um fator que define essa venda restrita.

Outra vantagem importante para a indústria da PIVE que é atendida é a possibilidade da sexagem de sêmen convencional descongelado. Nesse caso substitui-se, durante o processo da PIVE, a técnica a seleção dos espermatozoides viáveis pelo gradiente de sexagem. Essa substituição possibilita obter dois benefícios ao mesmo tempo após a centrifugação no gradiente de densidade para sexagem: seleção dos espermatozoides viáveis e seleção de 65%, em média, de espermatozoides X, sem diminuir significativamente a taxa de prenhez (HOSSEPIAN DE LIMA et al. 2003).

A técnica de citometria de fluxo não proporciona os mesmos benefícios que a centrifugação em gradiente de densidade. Os espermatozoides descongelados (sêmen convencional) têm a viabilidade diminuída significativamente quando são sexados pela citômetria de fluxo (UNDERWOOD et al., 2010). A utilização de espermatozoides descongelados diminui a eficiência de sexagem, pois o processo de congelação prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos, com Hoechst 33342 e a viabilidade espermática (JOHNSON et al., 1994).

Existem touros cujo sêmen *in natura* não resiste ao processo de sexagem por essa técnica (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007) ou produzem variações nas taxas de clivagem (0 a 89%) e de blastocistos produzidos (3,5 a 28,8%) (PALMA, et al., 2008), indicando que a citometria de fluxo compromete a capacidade fecundante dos espermatozoides (RATH et al., 2009). Portanto, se tem estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos de sexagem de espermatozoides (DE JONGE et al., 1997; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; 2003; CESARI et al., 2006; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007; CURRY et al., 2009; ALEAHMAD et al., 2009). Assim, tomando como exemplo os Estados Unidos e considerando a produção de “sêmen sexado” de todos os citômetros existentes no país isso representa menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado (WEIGEL et al., 2004).

## 2.2. Citometria de fluxo

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e, até o momento, é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozoides X ou Y *in vitro* (JOHNSON e WELCH, 1999). Essa diferença é cerca de 4,0 % mais DNA para os espermatozoides portadores do cromossomo X, e foi constatada em várias espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994).

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento e pela baixa produção/equipamento/hora, que não ultrapassa  $12 \times 10^6$  espermatozoides em alta velocidade de separação (JOHNSON e WELCH, 1999).

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

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

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos foram utilizados oócitos de 104 vacas de alto mérito genético e alto desempenho fenotípico. Os ovários foram

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

Na PIVE, observam-se diminuições nos parâmetros de fertilidade (taxa de blastocisto e de prenhez) (BEYHAN et al., 1999; BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2010).

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

Blondin et al. (2009) ao testarem vários níveis de heparina, obtiveram diferença  $P(\leq 0,01)$  para taxa de clivagem do grupo controle (68,2%) em relação ao grupo sexado por citometria de fluxo (80,6%), ambos a 10  $\mu\text{g}$  de heparina por mL de meio FIVE, houve também diferença significativa para a taxa de blastocisto, que foi maior para o grupo controle (32,8%) em relação ao grupo sexado (12,6%).

Trigal et al. (2012) também produziram embriões *in vitro* utilizando sêmen com espermatozoides sexado de 5 touros, e observaram redução na taxa de clivagem para o grupo sexados (5,6-26,3%) em relação ao grupo não sexado (14,8-40,3%), sendo esta diferença significativa, assim como também observaram menores taxas de blastocistos quando se utilizou espermatozoides sexados (8,5-10,0%) quando comparado com a utilização de espermatozoides não sexados (8,6-18,2%).

Rasmussen et al. (2013) demonstraram que a taxa de prenhez não apresentou diferença (21% *versus* 18%) aos 60 dias após a transferência de embriões produzidos *in vitro* com sêmen convencional e espermatozoides sexados

pelo citômetro de fluxo, respectivamente. Entretanto, houve diminuição de 32% na taxa de prenhez até o nascimento.

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

BERMEJO-ÁLVAREZ et al. (2010) avaliaram os efeitos do sêmen sexado no desenvolvimento embrionário e na abundância de transcritos de genes candidatos (GSMT3, DNTM3A, PGRMC1, TP53, BAX, COX2, IGF2R, AKR1B1 e PLAC8) para o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, concluíram que não houve diferença significativa no desenvolvimento de embriões (estadio de blastocisto) produzidos com sêmen sexado, comparando-se com o sêmen convencional, mas observaram uma redução na taxa de clivagem dos embriões produzidos com sêmen sexado. Em relação à abundância de mRNA, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, para os nove genes avaliados.

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

LUCIO (2011), avaliando os efeitos do processo da sexagem por citometria de fluxo, estudou o padrão de genes envolvidos no processo de formação da placenta e reconhecimento fetal, encontrou redução de 75% nos níveis de transcritos do gene

COX2, o qual é responsável pela produção de prostaglandina E, a qual está envolvida nos processos de elongação e implantação do embrião. Saint-Dizier et al. (2011) associaram a qualidade embrionária aos níveis de expressão de COX2. Blastocistos expandidos grau 1 (avaliados morfológicamente) apresentavam níveis elevados de mRNA de COX2, já os blastocistos com qualidade inferior apresentavam níveis reduzidos de transcritos, sugerindo que embriões produzidos *in vitro* de alta qualidade possuem maior competência embrionária e também grande capacidade de sintetizar PGE<sub>2</sub>.

### 2.3. Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação em gradiente de densidade baseia-se na diferença de densidade entre essas duas populações de espermatozoides. A análise da cabeça dos espermatozoides por microinterferometria demonstrou que os espermatozoides X contêm mais DNA e proteína nuclear que os espermatozoides 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 espermatozoides X ou Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de pelo menos  $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  ou 0,06% da densidade em relação a um espermatozoide X (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999).

Em bovinos, desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozoides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll, a partir do sêmen *in natura* com acuidade 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 et al., 2000; 2003).

Posteriormente, verificou-se que a centrifugação em gradiente de densidade de espermatozoides provenientes de sêmen congelado de bovinos sedimentava os espermatozoides X com acuidade média de 65%, quando esses eram utilizados para a produção de embriões *in vitro* (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; 2003). Essa média foi similar à obtida com a utilização de espermatozoides sexados pelo citômetro na primeira inseminação artificial, seguida de repasse de touro ou

inseminação com sêmen convencional, quando ocorria o retorno ao estro (WEIGEL, 2004). A taxa de clivagem foi de cerca de 80% e a taxa de desenvolvimento embrionário de cerca de 30% e até 68% de embriões do sexo feminino (LUCIO, 2007; RESENDE et al., 2010a; RESENDE et al., 2010b). Quando o sêmen sexado foi utilizado em cerca de 200 inseminações artificiais verificou-se 70% de taxa de prenhez e até 70% de fêmeas nascidas (HOSSEPIAN DE LIMA et al. 2003).

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

OLIVEIRA et al. (2012) demonstraram que a centrifugação em gradiente de Percoll aumentou a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e com membrana intacta. O número de células com membrana mitocondrial intacta também aumentou mas a porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto diminuiu.

LUCIO (2011) avaliou os efeitos da seleção do sexo de espermatozoides por gradiente de densidade pelo padrão de expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. Os embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por este método apresentaram níveis elevados de transcritos dos genes PLAC8 (formação da placenta), MnSOD (estresse oxidativo) e SCL2A1 (metabolismo celular).

O gene PLAC8, em bovinos, apresenta níveis mais elevados de transcritos em biópsias de blastocistos que geraram uma cria do que naqueles que sofreram perda gestacional, e também em células do endométrio de fêmeas gestantes comparadas com não gestantes (KHURANA e NIEMANN, 2000; GALAVIZ-HERNANDEZ et al., 2003; EL-SAYED et al., 2006). A elevada expressão de MnSOD é uma resposta positiva do embrião ao estresse oxidativo que está submetido *in vitro*, muitas vezes pelas condições dos meios de cultivo, temperatura, luz e tensão de oxigênio (MUNDIN et al., 2009). LOPES et al. (2007), avaliando as taxas de

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

## **2.4. O genoma paterno e o desenvolvimento embrionário**

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

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

Segundo BARROSO et al. (2009), o espermatozoide apto a fecundação é essencial para contribuição de pelo menos três componentes: o genoma haplóide paterno, a sinalização para iniciar a ativação metabólica do oócito (incluindo a tradução do RNA), e o centríolo, que direciona a montagem dos microtúbulos conduzindo a formação do fuso mitótico durante o desenvolvimento inicial do zigoto.

Uma fecundação bem sucedida é dependente de múltiplas qualidades inerentes aos oócitos. Porém nas últimas duas décadas, várias linhas de pesquisas mostraram resultados, a partir do uso de técnicas de reprodução assistida, que fornecem um suporte inicial para o conceito da contribuição paterna para fecundação defeituosa e embriogênese anormal. Fortes evidências associadas à presença de parâmetros espermáticos anormais (teratozoospermia, dano por estresse oxidativo e fragmentação do DNA) resultam em falha ou atraso na

fecundação e em desenvolvimento embrionário anormal (MERCAN et al., 1998; BARTOV et al., 2003; LIU et al., 2004; BARROSO et al., 2006).

O desenvolvimento embrionário é, primeiramente, dependente dos estoques de RNA mensageiros presentes nos oócitos, os quais são gradualmente exauridos até que o embrião produza os seus próprios transcritos. A expressão de genes paternos e a estabilidade do RNA em oócitos e em embriões em estádios iniciais de desenvolvimento são consideradas prioridades para a ativação da transcrição gênica embrionária (NIEMANN et al., 2007). O início da transcrição do genoma de embriões ocorre em um tempo espécie-específico. Em camundongos, a ativação tem início em embriões com duas células; em suínos, em embriões com quatro células; em humanos, de 4 a 8 células e em bovinos essa ativação ocorre no estádio de 8 a 16 células (TELFORD et al., 1990; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000).

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

A expressão padrão de mRNA de vários genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é um parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (FARIN et al., 2004; DODE et al., 2006) e quando este padrão de expressão é alterado, pode levar a desvios que afetam o desenvolvimento embrionário e a ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in vitro* estejam desprovidos do potencial para sustentarem a implantação e a prenhez (WRENZYCKI et al., 2005).

Durante o processo de sexagem os espermatozoides estão expostos a muitos riscos potenciais (MAXWELL et al., 2004) os quais podem ser responsáveis por alguns efeitos deletérios, como alterações no DNA ocasionadas pelo corante Hoesch 33342 (MORREL e DRESSER, 1989; GARNER, 2009) alterações no padrão de motilidade espermática (SUH et al., 2005), viabilidade reduzida (HOLLINSHEAD et al., 2003), aceleração da reação acrossomal (MOCÉ et al., 2006), aumento na proporção de células que sofreram capacitação espermática (MAXWELL et al., 1998). Também existem relatos que o uso de sêmen sexado por citometria de fluxo altera o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vivo* (McNUTT e

JOHNSON, 1996) e *in vitro* (CRAN et al., 1993; LU et al., 1999). Portanto, a baixa qualidade e a baixa viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* utilizando sêmen sexado podem ser conseqüências desses danos (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010).

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

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

A atividade de transcrição do blastocisto é mais alta que a detectada no estágio inicial de pré-implantação e, neste estágio, o genoma paterno tem um significativo papel na contribuição da função do embrião. Assim, e as alterações no DNA paterno podem prejudicar a implantação do embrião (PÉREZ-CRESPO et al., 2008).

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

## **2.5. Análise do transcriptoma em espermatozoides bovinos**

Transcriptoma refere-se ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Portanto, ele é o reflexo direto da expressão dos genes (COSTA et al., 2010).

O perfil do transcriptoma pode variar segundo o momento (numa dada fase do ciclo celular, por exemplo), estado fisiológico, estímulos físicos, químicos, biológicos ou doenças. Como são os mRNA os codificadores das proteínas e, portanto, o centro dos interesses da pesquisa sobre genômica funcional; na prática ficou estabelecido que o transcriptoma abrange o conjunto desta espécie de RNA. Entretanto, recentemente, os pesquisadores incluíram os microRNAs no conceito de transcriptoma por representarem uma classe muito importante de pequenos RNAs (contendo aproximadamente 20 a 22 nucleotídeos) que controlam a expressão gênica ao nível pós-transcricional, impedindo a tradução dos mRNA em proteínas (COSTA et al., 2010).

Para estudar o transcriptoma utilizam-se métodos de análise em grande escala como SAGE (do inglês *serial analysis of gene expression*) e os *microarrays* ou microarranjos (microarranjos de cDNA), os microarranjos de oligos e os *DNA-chips*). Recentemente o método de seqüenciamento em grande escala chamado de *deep sequencing* foi introduzido no estudo do transcriptoma (COSTA et al., 2010).

### **2.5.1. Análise do Transcriptoma de espermatozoides bovinos por microarranjo de DNA**

Microarranjo é uma técnica que detecta os níveis de expressão de transcritos em larga escala, ou seja, medindo muitos transcritos simultaneamente (WIDLAK, 2004).

Um microarranjo de DNA ou DNA-*chip*, consiste num arranjo pré-definido de moléculas de DNA (fragmentos de DNA genômico, cDNAs ou oligonucleotídeos) quimicamente ligadas à uma superfície sólida, usualmente lâminas de microscópio revestidas com compostos que conferem carga positiva. Os microarrays também podem ser preparados em membranas de *nylon* positivamente carregadas (WIDLAK, 2004; POWELL et al., 2013).

Os microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (mRNA na forma de cDNA ou DNA genômico) provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridar com o DNA fixado no *array* (hibridação por complementariedade de bases). A detecção é possível pois as amostras são "marcadas" com fluorocromos cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5) quando utiliza-se *microarrays* em vidro ou com o isótopo  $^{33}\text{P}$  quando os *arrays* são preparados em membranas de nylon (WIDLAK, 2004; POWELL et al., 2013).

Para ambos os casos faz-se necessário a geração de uma imagem de hibridação, que é obtida por meio de leitores (*scanners*) a laser (para os fluorocromos) ou leitores de fósforo (para o isótopo  $^{33}\text{P}$ ). O uso mais frequente dos microarranjos é na determinação da expressão gênica (perfil do transcriptoma). O alto desempenho desta técnica é que pode determinar a expressão diferencial de milhares de genes num único experimento. Para a preparação dos *microarrays*, utilizam-se robôs altamente precisos que aplicam as diferentes amostras de DNA em diminutos pontos (*spots*) no centro de uma lâmina de microscópio com a superfície quimicamente preparada (densidade aproximada de 10.000 pontos/cm<sup>2</sup>). Cada ponto representará um segmento gênico em particular. Quanto mais pontos no *microarray*, mais abrangente ele será na análise do transcriptoma. Também são preparados *oligo-microarrays* pela tecnologia de síntese *in-situ* (mais apropriadamente referidos como DNA-chips). Neste caso, os oligonucleotídeos são sintetizados na própria lâmina numa densidade de 30-50.000 pontos/cm<sup>2</sup> (WIDLAK, 2004; POWELL et al., 2013).

Lalancette et al., (2008) utilizaram a tecnologia de microarranjo para avaliarem a expressão diferencial de transcritos de espermáticos de touros com baixa fertilidade (baixa taxa de não retorno) e alta fertilidade (alta taxa de não retorno).

Posteriormente, Bissonnette et al. (2009) demonstraram que a diferença nos níveis de transcritos associados a taxa de não retorno estão relacionados a diferenças em níveis de transcritos que codificam uma proteína quinase serina/treonina (TSSK6) e RNA não codificado de uma metaloproteína (molécula de adesão) que estão associadas a alta motilidade.

Uma análise por microarranjos de DNA de espermatozoides de animais com taxas contrastantes de retorno (alta fertilidade *versus* baixa fertilidade) em lâminas contendo 24K sondas bovinas indicou um total de 415 transcritos diferencialmente expressos entre as duas classes de animais, dos quais 211 eram pelo menos duas vezes mais expressos em touros de alta fertilidade e 204, em touros de baixa fertilidade (FEUGANG et al., 2010). Segundo os autores, espermatozoides de animais com baixa fertilidade são deficientes em transcritos associados ao espaço extracelular, transportadores, fatores de transcrição e maquinaria de tradução, enquanto as amostras de alta fertilidade careciam de transcritos do ciclo celular, mas apresentavam altas concentrações de transcritos associados com transporte celular, atividade de receptores e espaço extracelular.

Como visto, a tecnologia de microarranjos de DNA tem contribuído muito para o conhecimento dos mecanismos moleculares que envolvem a espermatogênese e a etiologia genética da infertilidade em machos. Esta tecnologia de alto rendimento tem sido amplamente utilizada em estudos de perfil de expressão gênica global em espermatozoides humanos (OSTERMEIER et al., 2002), murinos e bovinos (GILBERT et al., 2007; FEUGANG et al., 2010). Embora os microarranjos de DNA tenham acurácia comprovada em estudos de expressão gênica global, a detecção se limita aos genes presentes nas lâminas. Essa cobertura limitada permite a identificação de 500 mil a 2 milhões de SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples) que é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base nitrogenada na sequência do genoma) dos mais de 10 milhões de SNPs presentes no genoma (COSTA et al., 2010). Essas bibliotecas não são exequíveis para detectar e avaliar transcritos variantes de alelos raros ou para estudos de tecidos ainda não bem caracterizados (LALANCETTE et al., 2008). Além disso, os microarranjos de DNA são sensíveis apenas para a detecção de transcritos

de média ou alta abundância. Assim, limitar o estudo do transcriptoma espermático ao uso apenas de técnicas de hibridização faz com que o conhecimento sobre o perfil transcricional destas amostras continue incompleto. Estas limitações podem ser superadas com o uso de seqüenciamento de próxima geração para estudos de transcriptomas.

### **2.5.2. Análise do Transcriptoma de espermatozoides bovinos por sequenciamento de RNA (RNA-seq)**

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) é uma tecnologia que utiliza as potencialidades do sequenciamento de próxima geração para revelar a presença de expressão gênica do genoma e a quantidade de RNA em um dado momento (COSTA et al., 2010).

O desenvolvimento recente do Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) permitiu aumentar a base de cobertura da sequencia de DNA, bem como aumentar a amostra analisada. Isto facilitou o sequenciamento de transcritos de RNA na célula. Além dos mRNA, o RNA-Seq analisa populações diferentes de RNA como RNA total e pequenos RNAs como os microRNAs (mRNA), RNA transportador (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA). O RNA-Seq também pode ser usado para determinar os limites entre exon e intron ou verificar os limites dos genes na direção 5' e 3' (WANG et al., 2009; COSTA et al., 2010).

O sequenciamento de transcriptomas requer a conversão de RNA mensageiro em moléculas de cDNA dupla-fita, cujo processamento leva à construção de uma biblioteca de cDNA fita simples, substrato para reações de PCR em emulsão que antecede o sequenciamento; este, por sua vez, pode se dar por pirosequenciamento (plataforma 454/ Roche), por síntese (Illumina/ Solexa) ou por ligação (SOLiD/ ABI) (WANG et al., 2009).

#### **2.5.2.1. Biblioteca de RNA 'Poli(A)'**

A criação de uma biblioteca de RNA Poli(A) pode mudar de plataforma para plataforma no sequenciamento de alto rendimento e cada uma requer *kits* desenhados para construir diferentes tipos de bibliotecas. Geralmente, na análise de mRNA a cauda 3' poliadenilada (poly(A)) é marcada para garantir que o RNA codificante seja separado do RNA não codificante.

O passo seguinte é a hidrólise do RNA em fragmentos de 200-300 nucleotídeos e a transcrição reversa. O cDNA sintetizado pode ser fragmentado para que se alcance o comprimento desejado de fragmento para o sistema de sequenciamento (WANG et al., 2009).

#### **2.5.2.2. Os benefícios da tecnologia do sequenciamento de RNA (RNA-Seq)**

O sequenciamento de última geração de RNA e alto rendimento permite que a cobertura do processo seja muito maior que o comprimento da sequência em estudo. Geralmente, a população de RNA (total or fracionado, como as poly(A)+) é convertida para uma biblioteca de fragmentos de cDNA. Cada molécula, com ou sem amplificação, é sequenciada de maneira a se obter sequências a partir de uma extremidade (*single-end sequencing*) ou ambas as extremidades (*pair-end sequencing*). As leituras são de 30–400bp, dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA utilizada. Após o sequenciamento, as leituras são alinhadas a um genoma referência ou a transcritos referência para se analisar o nível de expressão de cada gene (MARTIN e WANG, 2011).

Uma das vantagens do RNA-Seq em relação ao DNA microarranjos é o baixo sinal de *background* já que as sequências de DNA podem ser mapeadas sem equívocos como regiões particulares do genoma. O RNA-Seq não tem um limite para quantificação relacionado ao número de sequências obtidas. Consequentemente, essa tecnologia apresenta uma grande variação na dinâmica dos níveis de expressão em que os transcritos podem ser detectados. Em contraste, os microarranjos de DNA perdem a sensibilidade para os níveis de expressão gênica baixos ou altos e, assim, tem uma menor dinâmica de variação (MARTIN e WANG, 2011).

O RNA-Seq demonstra ter acuidade e repetibilidade para quantificar níveis de expressão gênica, como determinado por PCR quantitativo (qPCR) e requer menor quantidade de RNA nas amostras. Além disso, o RNA-Seq é o primeiro método de sequenciamento que permite sequenciar o transcriptoma inteiro em alto rendimento e de maneira quantitativa (MARTIN e WANG, 2011).

A metodologia mais direta para se conseguir dados sobre o impacto das tecnologias de sexagem de espermatozoides no genoma embrionário e sua associação com a qualidade do embrião é a análise do transcriptoma pelo sequenciamento de alto rendimento. De fato, a pesquisa em genômica sofreu um enorme impacto com a introdução do seqüenciamento de alto rendimento em 2005 (MOROZOVA e MARRA, 2008). Segundo esses autores, as novas aplicações incluem desde a obtenção de perfil e quantificação de expressão gênica, anotação gênica (BRENT, 2008) e detecção de rearranjos (RUAN e col., 2007) até a identificação de RNAs não codificados, como microRNAs e siRNAs (BEREZIKOV et al., 2006). Estudos de sequenciamento de próxima geração de pequenos RNAs, por exemplo, contribuíram para a descoberta de uma nova classe de pequenos RNAs – conhecida por *Piwi-interacting* RNA, piRNA – expressa em testículos de mamíferos e, possivelmente, necessária para o desenvolvimento de células germinativas (LAU et al., 2006; GIRARD et al., 2006).

A característica ímpar do sequenciamento de alto rendimento de transcriptomas é a versatilidade do resultado gerado, que pode ser analisado de forma a esclarecer simultaneamente dados de níveis de expressão gênica, de estrutura do *locus* genômico e variações de sequência presentes em um determinado *locus* (isto é, *single nucleotide polymorphism* – SNP) (MOROZOVA e MARRA, 2008).

Demonstrou-se que o espermatozoide transporta além do DNA paterno, moléculas de RNAs codificantes e não codificantes, tais como RNAs antissenso (aRNA) e microRNAs (miRNA) (CUMMINS, 2001; LALANCETTE et al., 2008). Dada a inabilidade do espermatozoide em sintetizar RNAs, supõe-se que as moléculas de RNA nele encontradas sejam remanescentes da espermiogênese (GILBERT et al., 2007).

Recentemente, foi publicado o primeiro resultado de análise de transcriptoma espermático bovino por seqüenciamento (RNA-seq) (CARD e col., 2013). Uma análise do transcriptoma espermático bovino de amostras de sêmen criopreservadas demonstrou a existência de mais de 6000 transcritos, codificados tanto pelo núcleo como pelas mitocôndrias; estes transcritos formam uma população heterogênea de mRNAs degradados e intactos. Inúmeros transcritos não descritos por trabalhos anteriores que utilizaram técnicas de hibridização puderam ser identificados por RNA-seq, entre eles HMGB4, GTSF1 e CKS2. Segundo os autores, uma análise de ontologia gênica demonstrou que o processo biológico mais representado por estes transcritos espermáticos é a tradução e a presença de transcritos intactos em uma célula silenciada sugere que estas moléculas podem ser traduzidas após o fim da espermatogênese, contribuindo para os processos de capacitação e início da embriogênese.

De fato, embora a função deste RNA não tenha sido totalmente esclarecida, a identificação de moléculas de RNA no espermatozoide maduro pode ser de grande importância para o melhor entendimento dos processos de espermatogênese e fertilização (LALANCETTE et al., 2008). Mais ainda, o perfil de expressão gênica dos espermatozoides pode servir tanto para a determinação da fertilidade de machos como possuir um valor prognóstico para fecundação e desenvolvimento embrionário (FEUGANG et al., 2010).

Os dados apresentados por Card et al. (2013) demonstram a maior habilidade do RNA-seq em caracterizar transcriptomas ainda não totalmente conhecidos do que as técnicas de hibridização.

## **2.6. HIPÓTESE**

A sexagem por citometria de fluxo altera o padrão de expressão gênica e o desenvolvimento embrionário in vitro quando comparada com o sêmen convencional e com a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade

### 3. OBJETIVOS

- 1) Caracterizar a expressão gênica diferencial em transcriptoma por RNA-seq de espermatozoides bovinos proveniente de sêmen convencional, sexados por centrifugação em gradiente de densidade ou sexados por citometria de fluxo;
- 2) Avaliar as taxas de blastocisto produzidos *in vitro* produzidos com os espermatozoides das mesmas partidas de sêmen analisadas no objetivo 1

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção dos espermatozoides e embriões nos grupos experimentais**

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

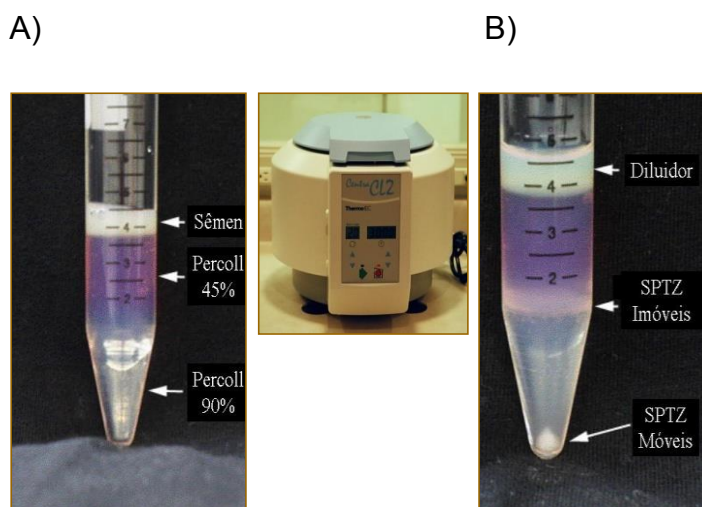
Os grupos experimentais para sêmen e embriões foram: 1) grupo controle: sêmen convencional submetido ao gradiente de Percoll™ 45/90%; 2) grupo gradiente: centrifugação em gradiente de densidade; 3) grupo citometria: sêmen sexado pelo citometro de fluxo, submetido ao mini gradiente de Percoll™ 45/90%.

### **4.2. Separação de espermatozoides móveis para caracterizar expressão gênica em transcriptoma**

#### **4.2.1. Grupo Controle**

As palhetas (duas palhetas por touro,  $25 \times 10^6$  espermatozóides/0,25 mL cada) de sêmen foram descongeladas a 35°C por 20 segundos e os espermatozoides móveis foram separados dos danificados e de células somáticas contaminantes por gradiente de Percoll (90-45%, 2mL:2mL, v:v). A solução de Percoll foi diluída em meio espermático *Tyrode* (Sp-TALP; NaCl 100mM, KCl 3,1mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3mM, Na lactato 21,6mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0mM, MgCl<sub>2</sub> 0,4mM, Hepes 10mM, piruvato 1,0mM e gentamicina 50ug/mL). Para esta separação, as amostras ( $25 \times 10^6$  espermatozóides) foram depositadas sobre gradiente de Percoll e centrifugadas a 700xg por 30 min. Os espermatozoides sedimentados (viáveis) foram lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS) e centrifugados a 4°C, a 300xg por 10 minutos para formação de um sedimento (aproximadamente  $12 \times 10^6$  espermatozoides) (Figura 1). Os sedimentos de espermatozoides foram colocados

em RNALater (Ambion, Austin, Tx, EUA, cat no. 76104) e a -20°C, até a extração do RNA total.



**Figura 1.** Gradiente de densidade de Percoll (45%/90%). Amostra de sêmen convencional descogelado depositada sobre gradiente (A). Sedimento de espermazóides móveis de bovinos, utilizado para a extração de RNA ou para a Produção *in vitro* de embriões (B). Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### 4.2.2. Grupo Gradiente de Sexagem

##### 4.2.2.1. Preparação dos gradientes de densidade de Percoll

A solução estoque (SE 90%) foi preparada diluindo-se 9 partes de sílica coloidal modificada (Percoll<sup>TM</sup> densidade 1,30 g/mL) em uma parte de DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) (densidade 1,058 g/mL; 1:9, v/v) concentrado 10 vezes (DMEM 10X) complementado com 0,01 g/L de antibiótico, 6 mM de HEPES; pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O (HOSSEPIAN DE LIMA et al. 2003).

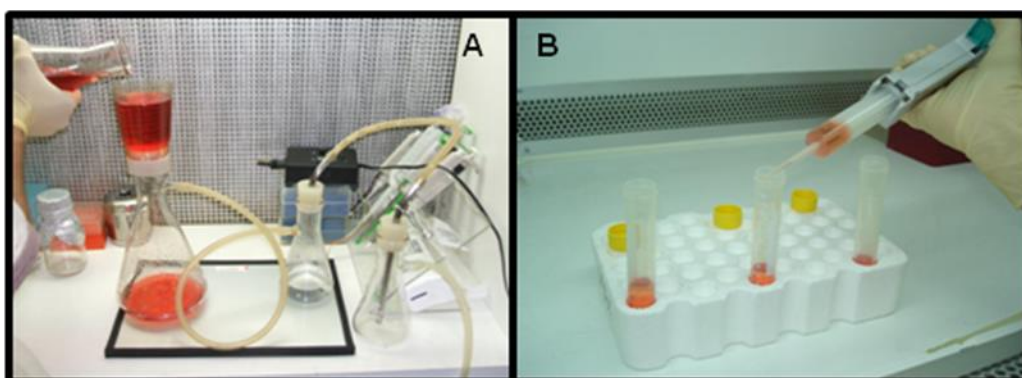
O DMEM 10X concentrado foi preparado diluindo-se, em 100 mL de água ultrapura bidestilada do Sistema Milli Q, a quantidade de pó necessária para preparar 1L. Em seguida, o meio foi filtrado em membrana com poros de 0,22 µm e estocado em temperatura entre 4 a 6 °C, por no máximo 15 dias.

Para obter os gradientes descontínuos de densidade, soluções isotônicas (280-320 mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O) com densidades diferentes foram preparadas diluindo-se diferentes porções de SE (Percoll<sup>TM</sup> 90%) em meio DMEM 1X, complementado com antibiótico, 6 mM de HEPES e 0,3 a 0,6% de albumina sérica bovina fração V (BSA); pH 7,4. O DMEM 1 X foi preparado segundo instruções do fabricante. Em seguida, foi filtrado em membrana com poros de 0,22 µm e estocado em temperatura entre 4 a 6°C por, no máximo, 15 dias (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003).

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

O gradiente utilizado neste estudo, foi composto por três camadas de 3 mL de soluções de Percoll<sup>TM</sup> com densidades variando entre 1,110 g/mL a 1,123 g/mL (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003).

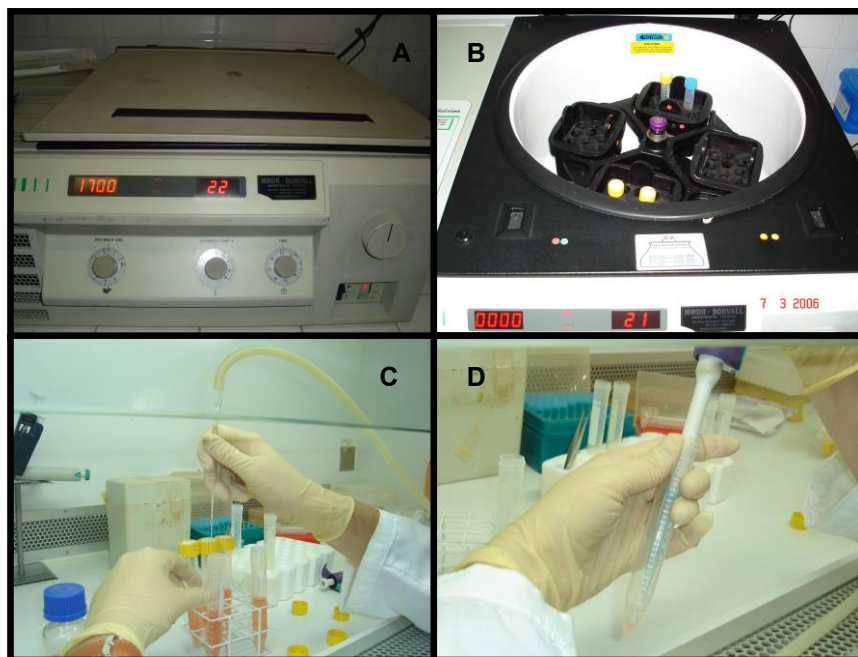
O gradiente descontínuo de densidade foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, as camadas de densidades diferentes, em tubos cônicos de poliestireno com o auxílio de pipeta de volume ajustável. Após a confecção dos gradientes, as amostras de sêmen foram depositadas sobre o gradiente (Figura 2).



**Figura 2.** Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção de gradiente descontínuo de densidade. Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### 4.2.2.2. Centrifugação e recuperação dos espermatozoides nos gradientes de sexagem

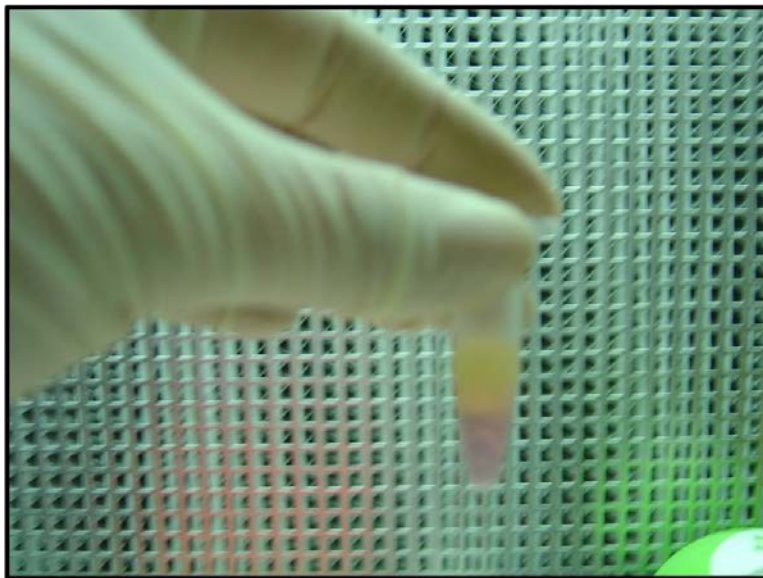
Três palhetas ( $25 \times 10^6$  espermatozoides por palheta) de cada touro foram descongeladas a  $35^\circ\text{C}$ . por 20 segundos. Cerca de  $75 \times 10^6$  espermatozoides foram depositados sobre cada gradiente descontínuo de Percoll<sup>TM</sup>. Os gradientes foram centrifugados a  $500 \times g$  em rotor horizontal, por 15 minutos, a  $22^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes foram retirados concomitantemente com a adaptação de um sistema de vácuo (*Vacusafe*). Os sedimentos de espermatozoides foram recuperados com auxílio de uma micropipeta, e utilizados nos procedimentos de produção *in vitro* de embriões (Figura 3).



**Figura 3:** Representação da etapa de centrifugação refrigerada de rotor horizontal (A e B); recuperação dos espermatozoides por um sistema á vácuo (C); recuperação do sedimento (D). Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### 4.2.3. Grupo citometria de fluxo

Para o grupo citometria de fluxo, dez palhetas ( $2,5 \times 10^6$  espermatozoides por palheta) com sêmen sexado foram descongeladas a  $35^\circ\text{C}$  por 20 segundos e centrifugadas em mini gradiente contendo 500 microlitros de cada uma das soluções de Percoll 45/90%. Centrifugou-se a  $900 \times g$  por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e sobre o sedimento foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de meio TALP-FIV. Procedeu-se centrifugação a  $500 \times g$  por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi retirado, deixando apenas 100  $\mu\text{L}$ . Cada placa de FIV continha cinco gotas de 30  $\mu\text{L}$  de meio TALP-FIV. Foram depositados em cada microgota 10  $\mu\text{L}$  de meio contendo os espermatozoides (Figura 4).



**Figura 4.** Representação do sêmen bovino depositado sobre o mini gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ 45% e 90%. Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### **4.2.4. Armazenamento dos espermatozoides para a extração do RNA**

Os sedimentos de espermatozoides foram colocados em microtubos de 1,5 mL com 300-500  $\mu$ L de “RNA/ater® Stabilization Solution” (Ambion®, Austin, EUA, cat. no. AM7020), que correspondeu a cinco vezes o volume de espermatozoides.

#### **4.3. Extração de RNA total de espermatozoide para caracterizar expressão gênica em transcriptoma**

Após a descongelação, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos a 4°C, a fim de sedimentar os espermatozoides para posterior extração de RNA.

A extração foi realizada utilizando TRIzol® Reagent (Ambion®, cat. no. 15596-018) seguindo as instruções do fabricante para amostras de tecido. Na fase de precipitação do RNA, utilizou-se 40 $\mu$ g de Glycogen (Invitrogen Oregon, EUA, cat. no. 10814-010, 20  $\mu$ g/  $\mu$ L) e na fase de ressuspensão, utilizou-se 25 $\mu$ L de água com dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen, cat. no. 750023).

##### **4.3.1. Quantificação do RNA total extraído**

A determinação da concentração do RNA total extraído foi realizada no NanoDrop 100 Spectrophotometer (V3.7 Thermo Scientific), utilizando-se 2 $\mu$ L de cada amostra para a quantificação do RNA total em ng/ $\mu$ L.

##### **4.3.2. Transcrição reversa**

As amostras de cDNA que foram utilizadas em ensaios de PCR em tempo real para verificação da contaminação com DNA genômico (gDNA). O cDNA foi sintetizado utilizando “SuperScript® II Reverse Transcriptase” (Invitrogen Brasil Ltda., cat. no. 18064-014), “Oligo (dT) 15 Primer” (Promega, Madri Espanha, cat. no.

C1101), “Random Primers” (Invitrogen, cat. no. 48190-011), “100 mM dNTP Set PCR Grade” (Invitrogen, cat. no. 10297-018), “RNase Out™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor” (Invitrogen, cat. no. 10777-019), conforme as instruções dos fabricantes.

A produção de cDNA foi pela reação com um “mix” contendo 1 µL “Oligo (dT) 15 Primer”, “Random Primers”, 1 µL de “100 mM dNTP Set PCR Grade” e 12µL de água “RNase-free”, o qual foi preparado e adicionado ao RNA extraído. Os tubos foram aquecidos a 65°C por 5 minutos, em seguida foram inseridos no gelo. Adicionou-se então o segundo “mix”, contendo 4 µL de “5X First-Strand Buffer”, 2 µL de 0,1 M DTT e 1 µL de “RNaseOUT™”. Os tubos foram incubados a 25°C por 2 minutos e, em seguida, 1 µL de “SuperScript II RT” foi adicionado em cada tubo, que, posteriormente, foram incubados por 50 minutos a 42°C. Para as reações de amplificação, as amostras de cDNA sintetizadas foram inicialmente diluídas 5 vezes.

#### **4.3.3. Controle de contaminação por DNA genômico**

Para a verificação de contaminação por DNA genômico foi realizada uma amplificação em PCR em tempo real (qPCR) do gene CD4, CD5 e da Protamina em um termociclador ABI7500 (Applied Biosystems). As reações de amplificação aconteceram em um volume final de 15 µL, contendo 1X SYBR Green Master Mix (Qiagen, cat no. 204054), 10 pmol de cada “primer” e 2,0 µL de cDNA ou 50 ng de gDNA. O perfil térmico utilizado foi de passo inicial de 95 °C por 10 min, seguido por 50 repetições de 95 °C por 15 sec e 60 °C por 1 min.

#### **4.3.4. Preparo da biblioteca de cDNA para o sequenciamento**

Todos os procedimentos necessários para a construção da biblioteca de cDNA a partir de RNA total, preparo dos *clusters* e amplificação das amostras foram realizados utilizando-se *kits* recomendados e produzidos pela Illumina, seguindo estritamente os protocolos recomendados pelo fabricante e adequados para a cobertura de 20 milhões de *reads*.

Para a construção da biblioteca de cDNA utilizou-se o *TruSeq PE cluster kit v3-cBot-HS* (Illumina, PN PE-401-3001) e para a amplificação das amostras, foi recomendado o *TruSeq SBS kit v3-HS* (Illumina, PN FC-401-3001), ambos conforme a utilização do fabricante.

#### **4.4. Produção *in vitro* de embriões**

A produção *in vitro* de embriões bovinos foi realizada segundo o protocolo de Gutiérrez-Adán et al. (2001; 2004) em três repetições.

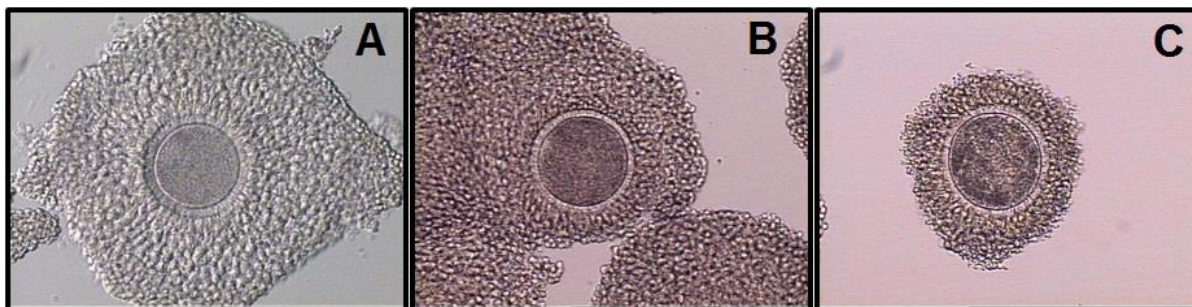
##### **4.4.1. Obtenção e seleção dos oócitos**

Os ovários bovinos coletados em abatedouros foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-33 °C, e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 19-G acoplada à seringa de 20 mL (Figura 3). O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15 minutos para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico (Figura 5).



**Figura 5:** Aspiração de ovários de matadouro. Unesp, Campus de Jaboticabal.

Foram selecionados os COCs (complexo oócito *cumulus*) que apresentaram no mínimo quatro camadas de células e ooplasma de coloração uniforme, ou seja, somente graus 1, 2 e 3 (Figura 6), assim como preconizado por De Loos et al. (1989). Foram descartados os oócitos considerados atrésicos e desnudos.



**Figura 6.** Representação dos Oócitos bovinos classificados como grau 1 (A); grau 2 (B); grau 3 (C); selecionados pós-aspiração para serem maturados *in vitro*.

#### 4.4.2. Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB. Foram transferidas 20 estruturas/microgota de 100 µL. Os oócitos foram maturados durante 22 a 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar (Figura 7).



**Figura 7:** Oócitos bovinos maturados *in vitro* após aspiração de folículos de ovários provenientes de abatedouro. Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### 4.4.3. Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 22 a 24 horas após o início do cultivo de maturação. Uma palheta de sêmen ( $20 \times 10^6$  espermatozóides/0,25 mL) foi descongelada à temperatura de 35 °C por 30 segundos. No **grupo controle** o sêmen foi depositado sobre gradiente de Percoll™ (45% e 90%) à temperatura ambiente e centrifugado a 900xg durante 30 minutos, a fim de sedimentar os espermatozoides viáveis. O sedimento espermático resultante desta centrifugação teve o volume medido. Foram retiradas duas amostras de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração, que foi ajustada para 25 mil espermatozoides com motilidade progressiva por µL. Aproximadamente  $100 \times 10^3$  espermatozoides foram adicionados à cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV designado a cada grupo experimental.

Para o grupo gradiente de sexagem, o gradiente do grupo controle (Percoll 45%:90%) foi substituído pelo gradiente confeccionado como descrito no item 4.2.2.1 e 4.2.2.2.

Para o **grupo de espermatozoides sexados por citometria de fluxo**, uma palheta de sêmen sexado ( $2,5 \times 10^6$  espermatozóides/0,25 mL) para fêmeas foi descongelada e submetida a um mini gradiente de Percoll 45/90% (total de 500 microlitros: 250 microlitros de cada densidade), o qual foi centrifugado a 700xg por 7

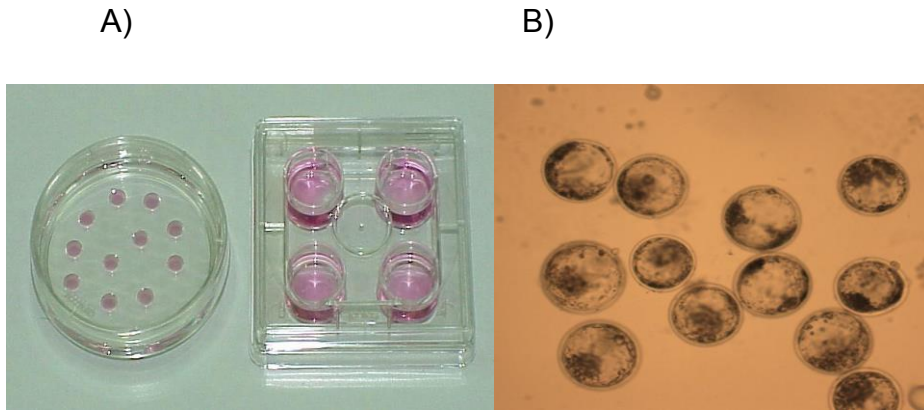
minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e sobre o sedimento foram adicionados 500  $\mu$ L de meio TALP-FIV, sendo submetido a outra centrifugação a 500 x g por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, deixando apenas 100  $\mu$ L. Cada placa de FIV terá cinco gotas de 30  $\mu$ L de meio TALP-FIV. Foram depositados em cada microgota 10  $\mu$ L de meio contendo espermatozoides. A concentração espermática não foi determinada devido ao baixo número de espermatozoides existentes na palheta.

Foram adicionados 20 oócitos por gota de FIV, e foram incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. A clivagem foi avaliada 48h após a FIV.

#### **4.4.4. Desenvolvimento *in vitro***

O desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* foi segundo os protocolos de VAJTA et al. (1999) e GUTIÉRREZ-ADÁN et al. (2001, 2004). Os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em fluído sintético de oviduto (SOF) suplementado com 6 mg/mL de BSA, sem SFB e sem glicose e transferidos para placas com quatro poços contendo 500  $\mu$ L do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fecundação. Foram cultivados 60 zigotos por poço (Figura 8), em estufa, com atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5 °C.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado oito dias após a fecundação e os blastocitos foram armazenados em solução *RNA later* (Qiagen, Hilden, DE, cat. no. 76104) até o momento da extração do RNA total.



**Figura 8:** Representação da placa para fecundação *in vitro* (A); Blastocistos expandidos produzidos *in vitro* (B). Unesp, Campus de Jaboticabal.

#### 4.4.5. Análise estatística dos resultados

---

Para a produção *in vitro* de embriões, a análise estatística foi feita pelo teste do Qui-quadrado (com nível de significância de 5%).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente trabalho, foram utilizados dois métodos de seleção do sexo de espermatozoides para a produção de embriões: a centrifugação em gradiente de densidade e a citometria de fluxo. Avaliou-se o desenvolvimento embrionário de ambas as técnicas e comparou-se ao grupo controle, utilizando sêmen não sexado. Os espermatozoides sexados por citometria de fluxo ou por gradiente de densidade foram submetidos à extração do RNA para análise do transcriptoma por RNA-seq para quantificar a expressão de genes candidatos para a qualidade embrionária, com o objetivo de verificar se as técnicas de sexagem alteraram o padrão de expressão destes genes.

### **5.1. Análise do transcriptoma de espermatozoides por RNA-seq**

#### **5.1.1. Extração de RNA de espermatozoides**

Na leitura no NanoDrop considerou-se que a extração de RNA pelo protocolo do TRIzol eleva a concentração do ácido nucleico em aproximadamente 3 vezes. Assim, por segurança, consideramos a quantificação real até cerca de 4 vezes menor para as amostras em que a concentração inicial era suficiente para isso (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação do RNA total pelo NanoDrop das amostras de sêmen de touros submetidos a diferentes tratamentos

| Quantificação (NanoDrop) |        |             |                               |                      |
|--------------------------|--------|-------------|-------------------------------|----------------------|
| amostra                  | ng/ uL | 260/<br>280 | Concentração<br>final (ng/uL) | Volume final<br>(uL) |
| ECs                      | 90,4   | 1.50        | 40                            | 50,0                 |
| ESs                      | 36,2   | 1.50        | 38                            | 50,0                 |
| EGs                      | 103,9  | 1.70        | 17,5                          | 50,0                 |
| MCs                      | 162,0  | 1.70        | 40,0                          | 25,0                 |
| MSs                      | 250,0  | 1.81        | 60,0                          | 25,0                 |
| MGs                      | 51,0   | 1.50        | 10,0                          | 25,0                 |
| SCs                      | 66,1   | 1.52        | 15,0                          | 25,0                 |
| SSs                      | 152,6  | 1.63        | 35,0                          | 25,0                 |
| SGs                      | 406,5  | 2.0         | 100,0                         | 25,0                 |
| sangue                   | 444,7  | 1.85        |                               |                      |

ECs- touro 1, sêmen convencional

ESs- touro 1, sêmen sexado pelo citômetro de fluxo

EGs- touro 1, sêmen sexado pelo gradiente de densidade

MCs – touro 2, sêmen convencional

MSs – touro 2, sêmen sexado por citômetro de fluxo

MGs – touro 2, sêmen sexado pelo gradiente de densidade

SCs – touro 3, sêmen convencional

SSs – touro 3, sêmen sexado pelo citômetro de fluxo

SGs – touro 3, sêmen sexado pelo gradiente de densidade

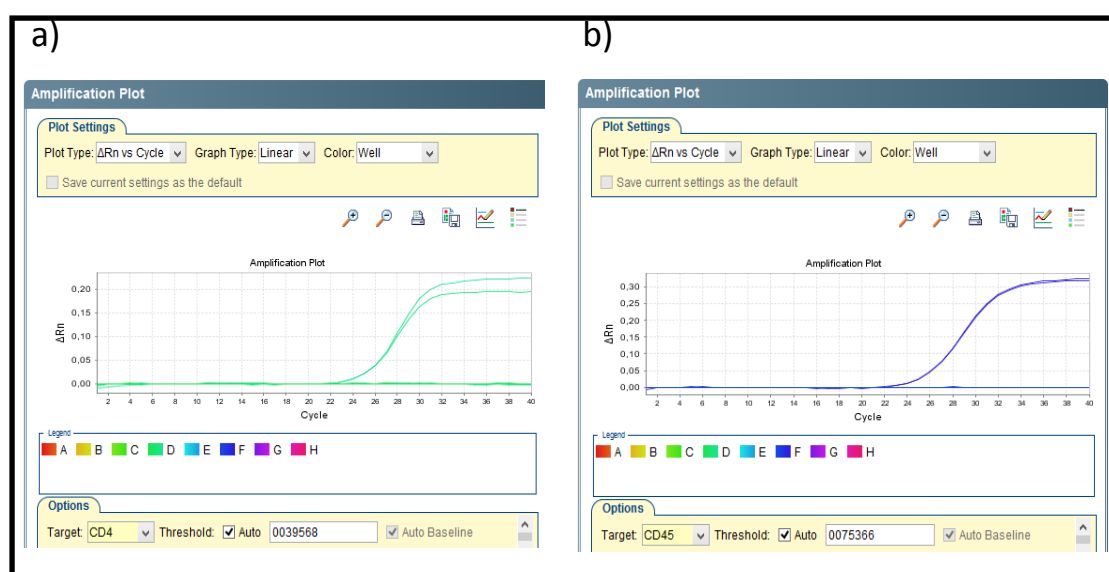
Sangue

Nesse trabalho, obtivemos cerca de 400ng de RNA por palheta ( $20 \times 10^6$  espermatozoides) considerando a perda de células espermáticas durante a centrifugação nos gradientes de densidade em todos os grupos experimentais. Isso representa o rendimento de 20 fg (Femtograma ( $fg$ ) =  $10^{-15}$  g) de RNA por espermatozoide. Esses resultados foram superiores aos de Card et al. (2013) que utilizando o protocolo de extração com TRIzol relataram um rendimento de 31fg de RNA por espermatozoide bovino utilizando duas palhetas com sêmen, em que o autor não informou a concentração espermática. Esses resultados corroboram os de GILBERT et al. (2007) que estimou que o rendimento esperado seria de 10 a 140 fg/célula.

### 5.1.2. Controle de contaminação por células somáticas e DNA genômico (gDNA)

Acredita-se que a extração utilizando o TRIzol® causa contaminação com o fenol, e isso pode subestimar a leitura de quantificação do RNA das amostras.

Na figura 9, temos a representação gráfica do perfil de amplificação de CD4 (a) e CD45 (b). Existe apenas amplificação em duas amostras-controle (cDNA de sangue) indicando que não há contaminação com células somáticas nas amostras de RNA extraídos dos espermatozoides.



**Figura 9:** Perfil de amplificação de CD4 (a) e CD45 (b) em cDNA construído a partir de RNA espermático

Para o **controle de contaminação por DNA genômico** foram utilizados *primers* para amplificação de protamina nas amostras de cDNA. Nesse caso, apenas um produto deve ser amplificado (234bp). Caso as amostras de RNA espermático estivessem contaminadas por gDNA, um produto de 315 bp seria co-amplificado com o de 234bp. Todas as amostras tiveram o produto de 234 bp amplificado (mas foram necessárias duas reações, sendo que na segunda, a concentração de *primer* foi aumentada de 0,2uM para 0,3uM. Não temos um gráfico único com o perfil de amplificação, mas dois gráficos complementares (Figura 10a).

Na curva de dissociação (Figura 10b) (que indica a presença de produto único ou não), há dois picos: o primeiro (seta azul) mostra o fragmento de 234bp das amostras de spz e o segundo (seta vermelha) mostra o pico de 315 da amostra controle (gDNA) pó que indicou que as amostras de RNA de espermatozoides não tinham pico de gDNA.



**Figura 10.** qPCR. a) curva de amplificação de protamina em amostras de cDNA espermático; b) um único pico de melting para protamina descarta a possibilidade de contaminação das amostras de RNA por gDNA.

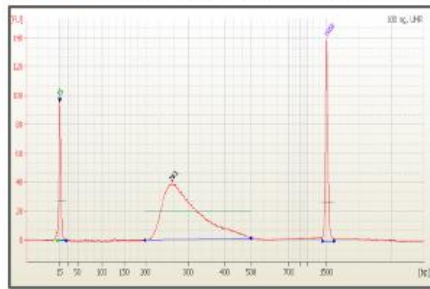
No presente trabalho não foi observada contaminação de células somáticas assim como encontrado por Card et al. (2013).

### **5.1.3. Preparo da biblioteca de cDNA**

A biblioteca de cDNA foi construída utilizando-se o *TruSeq PE cluster kit v3-cBot-HS* (Illumina, PN PE-401-3001) conforme a recomendação do fabricante mas os resultados não foram satisfatórios. Não foi possível a formação das bibliotecas de cDNA.

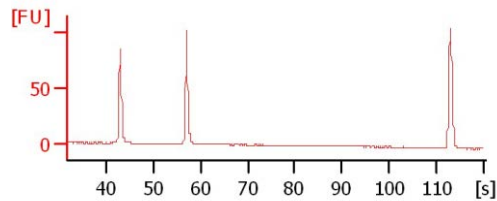
A figura 11a demonstra como as bibliotecas deveriam ter ficado e as figuras 11b,c,d como ficou a validação das bibliotecas feitas a partir do RNA extraído dos espermatozoides do sêmen convencional (b), sêmen sexado pelo citômetro de fluxo (c) e sêmen sexado pelo gradiente de densidade (d).

Figure 15 Example of TruSeq RNA Sample Prep v2 Library Size Distribution

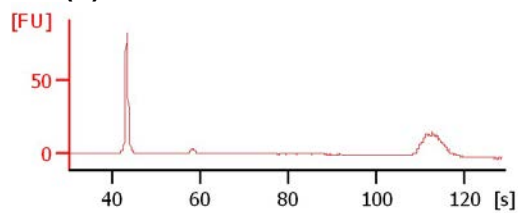


(a)

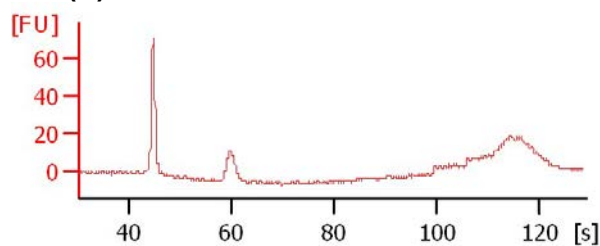
PC (b)



PS (c)



PG (d)



**Figura 11:** Validação por PCR em tempo real das bibliotecas de cDNA produzido a partir de RNA espermático. (a) padrão do fabricante; (b) PC = sêmen convencional; (c) PS = sêmen sexado pelo citômetro de fluxo; (d) PG = sêmen sexado pelo gradiente de densidade.

Os fragmentos pertencentes às bibliotecas deveriam ficar com um tamanho em torno de 260-280bp. Na validação das bibliotecas feitas a partir do RNA dos espermatozoides não apareceram fragmentos de biblioteca. Esse resultado é típico de amostras que produzem RNA degradado, como é o caso dos espermatozoides como descrito por Card et al. (2013) que descreveram os transcritos de

espermatozóide bovino como uma população heterogênea de mRNA nuclear codificado.

Apesar dessas limitações e em contraste com os resultados obtidos nessa dissertação, CARD et al. (2013) obtiveram sucesso na análise de transcrito de espermatozoides provenientes de nove touros por sequenciamento de alto rendimento, após amplificação seletiva de RNA poliA, a mesma metodologia utilizada no presente trabalho. O autor identificou 6 166 transcritos via alinhamento do genome bovino (UMD 3.1/bosTau6). Os níveis de transcritos (n=9 touros) do RNA-seq foram altamente correlacionados com o número de cópias validados pela PCR em tempo real ( $r^2 = 0.9747$ ). Os transcritos altamente abundantes incluíram o PRM1 e HMGB4 (ambos com função na elongação das espermátides) e 33 transcritos codificados pela mitocôndria (que representaram 0,5% do perfil de transcritos). Os transcritos completos compreenderam 66% dos 368 transcritos mais abundantes. A ontologia gênica revelou que a tradução foi o evento biológico mais representativo.

Este estudo de CARD et al. (2013) foi o primeiro a analisar o transcriptoma do espermatozoide bovino por RNA-seq. Entre os motivos pelos quais nossos resultados não serem similares aos desses autores pode-se sugerir o fato do RNA espermático ter sofrido, além da congelação, os danos causados pela sexagem por citometria de fluxo e centrifugação em gradiente de densidade. Essa justificativa também se aplicaria ao grupo controle (sêmen convencional congelado) já que o autor não utilizou o gradiente de Percoll para separar as células somáticas procedendo apenas a lavagem do sêmen em tampão fosfato salino.

## **5.2. Produção *in vitro* de embriões**

No presente estudo, ficou demonstrado que a sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo interfere no desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* já que os grupos experimentais diferiram entre si, tanto para taxas de clivagem como para as taxas de blastocisto (Tabela 2).

**Tabela 2.** Taxas de clivagem e produção total de Blastocistos e Blastocistos Expandidos *in vitro* em quatro tratamentos de espermatozoides bovinos

| <b>Grupos</b>        | <b>No. de oócitos</b> | <b>Taxa de clivagem (%)</b> | <b>Taxa de Blastocisto (%)</b> |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Gradiente de Sexagem | 3160                  | 2569 (81,3) <sup>a</sup>    | 979 (30,98) <sup>a</sup>       |
| Controle             | 2910                  | 2467(84,8) <sup>a</sup>     | 1021 (35,08) <sup>a</sup>      |
| Citometria           | 3093                  | 2202 (71,2) <sup>b</sup>    | 887 (28,7) <sup>b</sup>        |

Bl=blastocisto

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

A sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade resultou em 81,3% e 30,98% de taxas de clivagem e de blastocisto, respectivamente, corroborando os dados obtidos por LUCIO et al. (2007), utilizando o mesmo método de sexagem que observou taxas de clivagem de 70% e de blastocisto de 27,6%.

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

Os espermatozóides utilizados no presente estudo passaram por processo de congelação/descongelação e, após isto, foram submetidos à centrifugação nos gradiente de densidade. Os processos de congelação/descongelação aumentam a proporção de espermatozóides capacitados que sofreram reação acrossomal (BARABAS e MASCARENHAS, 2009), afetam a função mitocondrial (JANUSKAUSKAS et al., 2005), alteram a estrutura da cromatina espermática (GRAVANCE et al., 1998; THUNDATHIL et al., 1999) e induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que prejudicam a fertilidade (O'FLAHERTY et al., 1997). Assim, o fato dos resultados do grupo centrifugado em gradiente de

sexagem ser estatisticamente semelhante ao grupo controle pode ser devido a centrifugação em gradiente de densidade diminuir a proporção de espermatozóides inviáveis e aumentar o percentual de células com membrana plasmática íntegra (OLIVEIRA et al., 2012), selecionando os espermatozóides que não foram danificados pelo processo de congelamento/descongelamento. Da mesma forma, estudos anteriores comprovaram que a centrifugação de sêmen congelado/descongelado em gradiente de densidade de Percoll, selecionou espermatozóides sem fragmentação no DNA (RESENDE et al., 2010b), com motilidade elevada (70 a 80%).

Já a sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo apresentou 71,2% de clivagem (inferior ao grupo controle e ao gradiente de densidade) ( $P > 0,05$ ) e 28,7% ( $P > 0,05$ ) de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto, taxa inferior quando comparada aos grupos controle e gradiente de densidade.

UNDERWOOD et al. (2010), avaliando os efeitos da citometria de fluxo no desenvolvimento embrionário, encontrou 78,8% e 35,9% de taxas de clivagem e blastocisto, respectivamente, superiores aos dessa Dissertação. Outros experimentos também relataram taxas médias de clivagem de 70% e de blastocisto de 30% (ZHANG et al., 2003; LU et al., 2004; XU et al., 2006), demonstrando que a citometria de fluxo não afeta o desenvolvimento embrionário, mas que os efeitos deletérios desta metodologia podem aparecer em estágios mais tardios, como por exemplo durante a implantação do embrião (CARVALHO et al., 2010).

Também em contraste com nossos resultados, Blondin et al. (2009) ao testarem vários níveis de heparina, obtiveram diferença  $P(\leq 0,01)$  para taxa de clivagem do grupo controle (68,2%) em relação ao grupo sexado por citometria de fluxo (80,6%), ambos a 10  $\mu\text{g}$  de heparina por mL de meio FIVE, houve também diferença significativa para a taxa de blastocisto, que foi maior para o grupo controle (32,8%) em relação ao grupo sexado (12,6%).

Nossos resultados corroboram os de Bermejo-Alvarez et al. (2010), avaliando o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado por citometria, observaram redução nas taxas de clivagem e blastocisto (D7), 67,16% e 15,43%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle. Este experimento, apenas confirmou outros estudos desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa, onde observaram que o uso de sêmen sexado por citometria de fluxo afeta o

desenvolvimento embrionário, com taxas médias de clivagem e blastocisto, 60% e 15% respectivamente, quando comparados com o sêmen não sexado (85% de clivados e 40% de blastocistos) (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008).

Muitas vezes esses resultados são atribuídos aos efeitos deletérios que este processo de separação causa ao espermatozóide, como a capacitação e redução da longevidade espermática (MAXWELL, et al., 2004).

Nesse trabalho, os oócitos fecundados com sêmen sexado pelo citômetro só chegaram ao estadio de blastocisto após oito dias e demoraram mais para apresentarem as primeiras divisões celulares quando comparados com embriões produzidos com sêmen convencional ou com os espermatozoides sexados pelo gradiente de densidade. Bermejo-Alvarez et al. (2010) também fez a mesma observação. Este atraso na clivagem pode estar associado a danos causados pela citometria de fluxo como a redução da motilidade espermática (HOLLINSHEAD et al., 2003) e as baixas porcentagens de células com membrana e acrossoma intactos (CARVALHO et al. (2010), refletindo a diminuição de potencial para o desenvolvimento embrionário.

O atraso no desenvolvimento embrionário e danos no DNA também podem estar associados com outros fatores do processo de sexagem por citometria de fluxo como: a utilização do Hoeschst 33342; a utilização do laser; a exposição dos espermatozóides a cargas elétricas (LIBBUS et al., 1987). Danos no DNA de espermatozóides têm sido associados às baixas taxas de fecundação (AITKEN et al., 2004), prejuízos no desenvolvimento préimplantacional do embrião (FATEHI et al., 2006), alterações no padrão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (MORTON et al., 2007) e no aumento das taxas de aborto (BAKER e AITKEN, 2005).

Trigal et al. (2012) também produziram embriões *in vitro* utilizando sêmen com espermatozoides sexado de cinco touros, e observaram redução na taxa de clivagem para o grupo sexados (5,6-26,3%) em relação ao grupo não sexado (14,8-40,3%), sendo esta diferença significativa, assim como também observaram menores taxas de blastocistos quando se utilizou espermatozoides sexados (8,5-10,0%) quando comparado com a utilização de espermatozoides não sexados (8,6-18,2%).

Rasmussen et al. (2013) demonstraram que a taxa de prenhez não apresentou diferença (21% *versus* 18%) aos 60 dias após a transferência de embriões produzidos *in vitro* com sêmen convencional e espermatozoides sexados pelo citômetro de fluxo, respectivamente. Entretanto, houve diminuição de 32% na taxa de prenhez até o nascimento.

Alta variabilidade no desenvolvimento *in vitro* de embriões produzidos com sêmen sexado é reportado em vários estudos. Essa variação é devida em parte pela diferente capacidade dos touros em produzirem embriões *in vitro*, o que demonstra a grande efeito do touro nesse sistema.

Em média, as taxas de fecundação são de 10 a 20% menores em relação a produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen convencional. Esta evidencia foi comprovada no presente estudo onde a redução da taxa de clivagem e de blastocistos ocorreu em todos os touros utilizados como observados PR outros autores (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010; TRIGAL et al., 2012).

## 6. CONCLUSÃO

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

- a) o método de citometria de fluxo reduz a taxa de clivagem e de blastocistos produzidos *in vitro* quando comparado à utilização de sêmen convencional e centrifugado em gradiente de sexagem;
- b) não foi possível construir a biblioteca de cDNA a partir do RNA espermático *TruSeq PE cluster kit v3-cBot-HS* (Illumina, PN PE-401-3001).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ASBIA- Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório Anual, 2012.

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

BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.1-9, 2005.

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

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

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

BARTOV, B.; BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; KOGOSOVSKY, A.; YAGODA, A.; LEDERMAN, H. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 1413-1419, 2005.

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

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

BEREZIKOV, E.; THEUMMLER, F.; VAN LAAKE, LW.; KONDOVA, I.; BONTROP, R.; CUPPEN, E.; PLASTERK, RH. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet* 2006; 38:1375-1377.

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

BISSONNETTE, N.; LÉVESQUE-SERGERIE, J.P.; THIBAUT, C., BOISSONNEAULT, G. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. **Reproduction**, v.138, p.65-80, 2009.

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

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

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

BRENT, MR. Steady progress and recent breakthroughs in the accuracy of automated genome annotation. *Nat Rev Genet* 2008; 9:62-73.

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

CRV LAGOA. <http://www.crvlagoa.com.br/semensexado.asp?orig=3&id=84> consultado em 01 de Março de 2014.

CARD, C.J.; ANDERSON, E.J.; ZAMBERLAN, S.; KRIEGER, K.E.; KAPROTH, M.; SARTINI, B.L. Cryopreserved bovine spermatozoa transcript profile as revealed by high-throughput ribonucleic acid sequencing. **Biology of Reproduction**, v.88, n.49, p. 1-9, 2013.

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

CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNE'S, M. W.; ALBERIO, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 66, p. 1185–1193, 2006.

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

COSTA, V.; ANGELINI, C.; DE FEIS, I.; CICCODICOLA, A. Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/853916>

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

CUMMINS, J.M. Cytoplasmatic inheritance and this implications for animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 55, p. 1381-1399, 2001.

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

DE VRIES, A., M. OVERTON, J. FETROW, K. LESLIE, S. EICKER AND G. ROGERS. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 91, p. 847–56, 2008.

DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, 288–297, 2006.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006.

FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro produced and cloned embryos. **Journal of Animal Science**, suppl E, v.82, E53-E62, 2004.

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

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

FEUGANG, J.M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G.C.; TOPPER, E.K.; MEMILI, E.. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v.21: 312-24, 2010.

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

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

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

GILBERT, I.; BISSONNETTE, N.; BOISSONNEAULT, G.; VALLÉE, M.; ROBERT C. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v.133, p.1073-86, 2007.

GIRARD, A.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, GJ.; CARMELL, MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. **Nature**, v.442, p.199-202, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LALANCETTE, C.; THIBAUT, C.; BACHAND, I.; CARON, N.; BISSONNETTE, N. Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. **Biology of Reproduction**, v.78, p.618-35, 2008.

LAU, NC.; SETO, AG.; KIM, J.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; NAKANO, T.; BARTEL, DP.; KINGSTON, RE. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 2006, 313:363-367.

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

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

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

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

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

LUCIO, A. C. **Expressão gênica diferencial em embriões bovinos produzidos *in vitro* com sêmen sexado por gradiente de densidade e por citometria de fluxo.** 2011, 102f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

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

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

MARTIN, J.A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Review Genetic**, v.12, p.671-82, 2011.

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

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

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

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

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

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929–936, 2006.

MOROZOVA, O; MARRA, MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008; 92 :255–64.

MORRELL, J. M.; DRESSER, D. W. Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. **Mutation Research**, v. 224, p. 177-183, 1989.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-citometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.931-40, 2007.

MUNDIN, T.C.D.; RAMOS, A.F.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; MELO, E.O.; GOMES, L.S.F.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics Molecular Research**, v. 8, p. 1398-1407, 2009.

NIEMANN, H.; CARNAWATH, J. W.; KUES, W. Application of DNA array technology to mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 68 (Suppl. 1), p. 165-177, 2007.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21–34, 2000.

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

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.; DE ANDRADE, A.F.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v.44, p.9-15, 2012.

OSTERMEIER, G.C.; DIX, D.J.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S.A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **Lancet**, v.360, p.772-7, 2002.

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

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

POWELL, J.R.; BENNETT, M.; WATERS, R.; SKINNER, N.; REED, S.H. Functional genome-wide analysis: a technical review, its developments and its relevance to cancer research. **Recent Patways in DNA Gene Sequencing**, v.7, p.157-66, 2013.

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

RASMUSSEN, S.; BLOCK, J.; SEIDEL JR, G.E.; BRINK, Z.; McSWEENEY, K.; FARIN, P.W.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J. Pregnancy rates of lactating cows after

transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**, v.79, p.453-461, 2013.

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

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

SAINT-DIZIER, M.; GRIMARD, B.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A.A. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine *in vitro*-produced embryos. **Zygote**, v.19, p.277-283, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J.N.; MUÑOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DIEZ, C. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.78, p.1465-1475, 2012.

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

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

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Review Genetics**, v.10, p. 57–63, 2009.

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

WIDLAK, P. DNA microarrays, a novel approach in studies of chromatin structure. **Acta Biochimica Polonica**, v.51, p.1-8, 2004.

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

WILSON, R.D.; WEIGEL, K.A.; FRICKE, P.M.; RUTLEDGE, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; MATTHEWS, D.L.; SCHUTZKUS, V.R. *In vitro* production of Holstein embryos using sexed sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p. 776-782, 2005.

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

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

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

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

ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v.60, p.1657-1663, 2003.