

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VARIAÇÕES METODOLÓGICAS NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO SEXADO

CAMILA DE PAULA FREITAS



Botucatu – SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

VARIAÇÕES METODOLÓGICAS NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN BOVINO SEXADO

CAMILA DE PAULA FREITAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Reprodução Animal).

Orientador: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Co-orientador: Dr. José Antonio Dell’Aqua Junior

Botucatu – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Freitas, Camila de Paula.

Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado / Camila de Paula Freitas. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Co-orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Inseminação artificial 3. Sêmen

CDD 636.208245

Palavras-chave: Bovino; Criopreservação; Meios diluidores; PIV; Sêmen sexado

Aos meus pais que sempre me
apoiaram e sempre estiveram
presentes dando-me amor e incentivo
sem medir esforços para eu poder
alcançar os meus ideais

DEDICO, com muito amor e carinho

Ao meu noivo, em quem com uma brincadeira acabei encontrando meu grande amor, um encontro que mudou a minha vida. Agradeço a paciência, os ensinamentos e o apoio durante esta fase.

TE AMO

DEDICO, com muito amor e carinho

A minha orientadora e amiga *Profa Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga*, a quem devo a oportunidade de crescimento profissional e pessoal, minha admiração pelo profissionalismo e capacidade.

DEDICO, com muito amor e carinho

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – São Paulo – Brasil e ao Curso de Pós-graduação da Área de Reprodução Animal pela oportunidade concedida.

À Sexing Technologies do Brasil pelo apoio para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos que trabalham comigo e me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho. Adriano, Axel, Daniel, Daniela, David, Diogo, Erika, Marcelo, Marialine, Priscilla, Renata, Viviane, como prometido. Especialmente ao Osvaldo e ao Evanil pela oportunidade de realizar este projeto.

Àqueles que não trabalham mais comigo, mas durante um período me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa, Thiago, Esther, Carla, Shiroma desejo muita sorte para vocês.

Aos professores: Marco Antonio Alvarenga e Frederico Ozanam Papa, não só pela ajuda, orientação e sugestões apresentadas no decorrer do desenvolvimento deste projeto, mas principalmente pela contribuição para minha formação.

Também aos Professores: Eunice Oba, Sony Dimas Bicudo, Cezinande de Meira, João Carlos Pinheiro Ferreira, Nereu Carlos Prestes e Maria Denise Lopes pela amizade e pelos muitos ensinamentos e constantes incentivos ao longo de todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pela colaboração na realização da fertilização *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda e à Profa. Dra. Eneiva Carla Celeghini, pelo treinamento para a realização da avaliação de células espermáticas através de sondas fluorescentes.

A minhas grandes amigas Carla, Karina e Lindsay pela convivência deste a residência e que, mesmo com caminhos diferentes, continuam presentes.

A dois grandes amigos, Carla e Michael, que estão sempre torcendo por mim e eu por eles.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo apoio durante a execução deste trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do Campus de Botucatu, pelo suporte e colaboração na ficha catalográfica.

Ao mestrando Gustavo pela grande ajuda na elaboração da análise estatística.

A CAPES/CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a execução deste experimento.

RESUMO

FREITAS, C. P. Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado (Methodological variations on freezing bovine sexed semen). 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

Está sendo amplamente difundida no Brasil e no mundo a sexagem de sêmen bovino através de citometria de fluxo. Considerando que não só o processo de criopreservação como também o processo de separação causam danos às células, esses danos têm sido amplamente estudados buscando-se alcançar maior proteção para o sêmen sexado durante a congelação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de congelação de sêmen sexado bovino com a utilização de dois diferentes diluentes. Para isso, 2 ejaculados de 10 touros em idade reprodutiva foram coletados em vagina artificial, avaliados e preparados para a separação por citometria de fluxo. Após a passagem pelo citômetro, as amostras foram divididas em 3 grupos (diferentes metodologias). Todos os grupos foram divididos em 2 subgrupos (diferentes diluentes: TRIS – meio extensor padronizado pelo laboratório em questão e o diluente Botu-Bov®, meio extensor comercializado no Brasil – Biotech Botucatu). Para o grupo 1 (GI) a metodologia utilizada foi a mesma padronizada pelo protocolo Sexing Technologies do Brasil; para o grupo 2 (GII), foi utilizado glicerol para o início da refrigeração; e para o grupo 3 (GIII) a glicerilização foi realizada a 18°C e não a 5°C como no controle (GI). A avaliação do sêmen foi realizada através de análise computadorizada (CASA) e por sondas fluorescentes para função mitocondrial e integridade da membrana plasmática e acrossomal. Para análise estatística utilizou-se o método Tukey com nível de significância $p < 0,05$. Em relação às metodologias utilizadas, não ocorreu diferença estatística para os parâmetros avaliados através da análise computadorizada do movimento espermático; apenas o percentual de membrana plasmática intacta do GII com meio TRIS apresentou menor valor em relação aos outros grupos também com diluente TRIS. Em relação aos diluentes ocorreu diferença significativa para os principais parâmetros avaliados (CASA e integridades de

membranas), sendo que o diluente Botu-Bov® apresentou melhor avaliação. Assim para o teste de fertilidade foi padronizada a utilização do protocolo GI com os dois diluentes. O teste foi realizado em dois laboratórios comerciais (TECGEN e Lagoa da Serra). A utilização do diluente Botu-Bov® apresentou uma maior motilidade e maior recuperação de células pós-percoll e, no entanto, não diferiu estatisticamente do controle. De acordo com os dados obtidos pode-se afirmar que o diluente Botu-Bov® apresentou uma maior proteção celular para os danos causados pela criopreservação do que o diluente TRIS e assim contribuiu para uma maior produção de embriões *in vitro*.

Palavras-chave: sêmen sexado, bovino, criopreservação, PIV, meios diluidores.

ABSTRACT

FREITAS, C. P. Methodological variations on freezing bovine sexed semen (Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado). 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

The sexed semen using flow cytometry has been widely spread in Brazil and all over the world. The damage caused by the process of cryopreservation and separation is well known. Therefore, the sexed semen needs a higher protection during freezing process. The aim of the present study was to develop a bovine sexed semen freezing methodology with two different extenders. Thus 2 ejaculates of 10 bulls in reproductive age were collected with artificial vagina, analyzed and then prepared for the separation with flow cytometry. After this procedure the samples were divided in 2 groups (different methodologies) and both groups were divided in 2 subgroups (different extenders: TRIS and Botu-Bov®). For group 1 (GI) the methodology applied was the same standardized by the protocol of Sexing Technologies of Brazil; for group 2 (GII) it was used glycerol for the beginning of the freezing and for group 3 (GIII) addition of glycerol was made at 18°C. The semen evaluation was made through CASA and fluorescent probes for the plasmatic and acrosomic membrane integrity and mitochondrial function. The statistic analysis was achieved using the Tukey method with significant level $p < 0,05$. There was no significant statistic difference for the analyzed parameters in regard to the methodology used; only the percentual of intact plasmatic membrane from GII with TRIS presented a smaller value compared to the other groups, also using TRIS. A significant difference between the extenders occurred in the main parameters evaluated, and Botu-bov® presented better results. The Botu-Bov® extender presented higher motility and higher number of cells after percoll. There was no significant statistic difference between Botu-Bov® extender and thawed-frozen semen

non-sorted. These data show that Botu-Bov® extender improves better protection for spermatozoa during the freezing protocol and higher embryo development than TRIS extender.

Key words: sexed semen, bovine, cryopreservation, **PIV**, extenders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental	39
Figura 2 – Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação de sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005) aumento de 1000x. A e B representam células espermáticas com membrana celular e acrossomal íntegras e alta função mitocondrial. C representa célula com membranas plasmática e acrossomal intacta com baixa função mitocondrial. D representa célula com membrana celular intacta, membrana acrossomal lesada e alta função mitocondrial. E representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e baixa função mitocondrial. F representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial. G representa duas células: uma com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial (superior) e outra com membrana celular e acrossomal lesadas com baixa função mitocondrial. H representa célula com membranas celular e acrossomal lesadas e alta função mitocondrial.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	47
Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	49
Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: deslocamento lateral de cabeção (ALH) e frequência de batimento de cauda (BCF) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	50
Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: retilineariedade (STR) e lineariedade (LIN) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	51
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: alongação (ELONG - μm) e área (μm^2) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	52

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e alta potencial mitocondrial (APM) analisados através de associação de sondas fluorescentes de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.....	54
Tabela 7 – Resultados de fertilização e produção de embriões <i>in vitro</i> de sêmen convencional (controle) e sexado com dois diferentes diluentes (Botu-Bov® e TRIS).....	55
Tabela 8 – Valores médios de motilidade pós percoll (%) e rendimento da palheta de acordo com o diluente utilizado.....	56

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão de Literatura.....	19
2.1 Separação por citometria de fluxo.....	21
2.1.1 Danos causados pelo processo de separação do sêmen sexado.....	21
2.2 Criopreservação de sêmen.....	23
2.2.1 Danos causados pela criopreservação.....	25
2.2.2 Criopreservação de sêmen sexado.....	25
2.3 Avaliação funcional e morfológica da célula espermática.....	26
2.3.1 Motilidade.....	26
2.3.2 Membrana plasmática.....	27
2.3.3 Acrossomo.....	28
2.3.4 Função mitocondrial.....	29
2.3.5 Associação de sondas fluorescentes.....	30
2.4 O uso do sêmen sexado.....	31
3. Objetivos.....	33
4. Material de métodos.....	35
4.1 Local.....	36
4.2 Touros.....	36
4.3 Separação por citometria de fluxo.....	36
4.4 Delineamento experimental.....	37
4.4.1 Primeira etapa.....	37
4.4.1.1 Grupo I.....	37
4.4.1.2 Grupo II.....	39
4.4.1.3 Grupo III.....	39
4.4.2 Segunda etapa.....	40
4.4.2.1 Análise computadorizada do sêmen.....	40
4.4.2.2 Análise morfológica através de sondas fluorescentes.....	40

4.5	Teste de fertilidade <i>in vitro</i>	40
4.6	Análise estatística.....	44
5.	Resultados.....	43
5.1	Análise laboratorial do sêmen.....	44
5.2	Análise de fertilidade <i>in vitro</i>	55
6.	Discussão.....	57
6.1	Efeito da metodologia de congelação sobre os parâmetros espermáticos.....	58
6.2	Efeito do diluidor de congelação sobre os parâmetros espermáticos.....	60
6.3	Efeito do diluidor sobre a fertilidade <i>in vitro</i>	64
7.	Conclusão.....	68
	Referências bibliográficas.....	70
	Anexos.....	83

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira, tanto leiteira quanto de corte, apesar de algumas dificuldades na política e na economia do país, vem crescendo e se consolidando como uma importante fonte selecionadora de genética. Além disso, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne. Isto se deve ao emprego de algumas biotecnologias que aperfeiçoam o sistema de produção, buscando produzir mais com menor custo.

Várias destas biotecnologias de ponta ligadas à pecuária nacional são desenvolvidas e/ou aprimoradas em território brasileiro, assim como ocorreu com a transferência de embriões e a produção *in vitro*. É o que está acontecendo recentemente com a sexagem espermática, que se aplicada de forma comercial mais ampla agregará grandes benefícios à criação nacional, proporcionando um aumento substancial do número de matrizes, imprimindo uma velocidade de seleção genética imensurável.

Esta nova biotecnologia poderá tornar ainda mais relevante o papel de outras tecnologias de reprodução, tais como a inseminação artificial em tempo fixo, transferência de embriões e produção *in vitro*, maximizando o progresso genético entre gerações e aumentando a produtividade e o retorno econômico.

Apesar da existência de diferentes métodos de separação de gametas contendo cromossomo X e Y, o mais difundido comercialmente é a citometria de fluxo, que se baseia na diferença na quantidade de DNA contido em cada uma das células. Em bovinos o gameta contendo o cromossomo X possui aproximadamente 3,8% mais DNA do que o gameta contendo cromossomo Y. Sendo assim, quando marcados com o corante fluorescente Hoechst 33342, o gameta com mais DNA seria mais facilmente detectado e separado dos demais.

Entretanto, o processo é um pouco mais complicado do que parece, pois durante a separação devem ser levados em consideração os efeitos dos corantes específicos para DNA, a suscetibilidade do gameta à exposição ao laser, à alta pressão e à velocidade durante a passagem do espermatozóide

pelo citômetro, a refrigeração e posterior congelação do sêmen e vários outros eventos que ocorrem antes de depois da separação espermática.

Para o sucesso comercial da sexagem espermática, tanto em bovino quanto em outras espécies, deve-se levar em consideração não só o estresse sofrido pelo gameta durante o processo de separação, mas também os danos ocorridos durante a congelação. Sabe-se que em uma dose comercial de sêmen sexado a concentração de espermatozóides pode ser até 10 vezes menor do que em uma dose de sêmen convencional. Sabe-se ainda que sua viabilidade pós-descongelação é menor, e por isso, quando comparada a doses convencionais com a mesma concentração, sua fertilidade também é mais baixa. Assim, um dos fatores para melhorar o uso desta nova biotecnologia é a utilização de diluidores eficientes para uma melhor proteção da célula durante o processo de congelação, promovendo uma maior viabilidade espermática no pós-descongelação.

Diante disso, o objetivo geral deste experimento foi desenvolver melhores procedimentos para a congelação de sêmen sexado bovino de forma a contribuir para o avanço desta biotecnologia na espécie bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A célula espermática é formada no testículo (FRANCA *et al.* 2005) e sua maturação ocorre durante o trânsito epididimário (DACHEAUX *et al.*, 2005). Após a ejaculação o espermatozóide deve alcançar a parte do istmus do oviduto no lado ipsilateral onde ocorreu a ovulação (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005). Durante este trajeto ocorrem na célula espermática modificações que lhe conferem a habilidade de se ligar à zona pelúcida do ovócito (HARRISON e GADELLA, 2005; RATH *et al.*, 2005). Esta ligação induz a reação acrossômica e a hiperativação do espermatozóide, possibilitando sua entrada dentro do ovócito (FLESCH e GADELLA, 2000).

Após a fertilização, o DNA é descondensado formando o pronúcleo masculino: este se liga ao pronúcleo feminino e forma-se então uma célula diplóide que vai dar origem a um novo indivíduo (MCLAY e CLARKE, 2003).

Assim, todas as características estruturais do espermatozóide estão voltadas para sua única atividade: o sucesso da concepção. É necessário portanto, para que uma célula espermática seja fértil, que ela apresente membranas, organelas e DNA intactos.

Nas técnicas de reprodução assistida, tais como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV), entre outras, o sêmen não é colocado diretamente da ejaculação no trato genital da fêmea. Ele passa por diversos procedimentos iniciados pela coleta, que pode ser através de vagina artificial, eletroejaculação e estimulação manual, sendo então diluído em meios extensores para ser refrigerado e congelado. E só depois desses procedimentos é que será utilizado para qualquer uma das técnicas de fertilização acima mencionadas.

Após a coleta, o sêmen pode ainda passar por outro procedimento no qual os gametas portadores do cromossomo X são separados daqueles com o cromossomo Y e só então são criopreservados. Todos estes procedimentos acabam levando a danos na célula espermática causando uma diminuição da sua capacidade de fertilização.

Em virtude do crescente interesse comercial na sexagem de sêmen, torna-se necessário buscar melhorias tanto no procedimento de separação

quanto no de criopreservação: para isto é necessário ressaltar alguns pontos cruciais do processo que podem ocasionar danos na estrutura celular prejudicando sua fertilidade. E dentre estes, é particularmente importante a avaliação da interação das células espermáticas com os diferentes meios diluidores através de técnicas de avaliação espermática.

2.1 Separação por citometria de fluxo

Existem vários procedimentos de sexagem espermática (AMANN e SEIDEL, 1982; SEIDEL e GARNER, 2002a), mas, até o momento, apenas um apresenta eficácia realmente comprovada e viável comercialmente. Trata-se do procedimento baseado na mensuração da diferença na quantidade de DNA entre as células portadoras do cromossomo X e Y. No caso da espécie bovina os espermatozoides portadores do cromossomo X apresentam em média 3,8% mais DNA que os portadores do cromossomo Y. Assim, através de sondas fluorescentes como HOESCHT 33342, as células são coradas e, ao passarem através de um citômetro de fluxo (JOHNSON, 2000), são separadas de acordo com a intensidade de fluorescência.

A acurácia do procedimento de separação é, rotineiramente, de aproximadamente 90%, podendo variar de 87% a 95% dependendo do operador, da velocidade e das variações individuais do ejaculado cada touro.

Segundo Seidel (2003a) a velocidade da separação é a primeira limitação desta tecnologia, já que interfere diretamente na pureza do procedimento: assim, quando a velocidade é baixa pode-se ter uma pureza de mais de 93% e quando rápida pode chegar a 87%. Outro dado importante também abordado por Seidel (2003a) é que a velocidade também depende da qualidade do ejaculado: quando este apresenta altas porcentagens de células mortas (lesão de membrana) também diminui consideravelmente a pureza da amostra.

A velocidade de separação geralmente é de 3000-4000 células vivas por segundo com uma acurácia de 90% em média, e isto já é considerado um grande avanço quando comparado aos resultados obtidos há alguns anos (SEIDEL, 2003b).

Para uma maior viabilidade econômica desta biotecnologia, poucos espermatozóides devem ser usados por dose na inseminação (SEIDEL *et al.*, 1999). No Brasil são comercializadas em geral doses de 2,1 milhões, 3 milhões, 5 milhões e 10 milhões de espermatozóides por palheta de 0,25 mL, de acordo com as centrais que industrializam esse sêmen. A principal consequência disto é a baixa fertilidade, que ainda é exacerbada pelos danos ocorridos na célula durante o procedimento de separação (SEIDEL *et al.*, 1999).

2.1.1 Danos causados pelo processo de separação do sêmen sexado

O sucesso da separação espermática deve levar em consideração a suscetibilidade dos gametas à coloração, a exposição ao laser, a elevada pressão e a resistência de várias mudanças na composição dos meios que ocorrem durante o procedimento (MAXWELL *et al.*, 1998).

Examinando a integridade do DNA de espermatozóides de bovino através da técnica de Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) durante várias etapas do processo de separação, Garner (2001) indicou que não somente a exposição ao HOECHST 33342 e ao laser eram fatores que contribuíam para as injúrias mecânicas ocorridas. Testes de viabilidade espermática com SYBR-14 e iodeto de propídio mostraram que o estresse mecânico da separação e da centrifugação aumentou a porcentagem de espermatozóides mortos ou lesados para 18,6%, enquanto que naqueles separados sem coloração a lesão foi de apenas 6,8%. Já aqueles que foram apenas corados com HOECHST 33342 sem exposição ao laser apresentaram 3,6% de lesão e a combinação do uso de HOECHST 33342 com a exposição ao laser levou a somente 0,3% de dano (SEIDEL e GARNER, 2002a).

A diminuição da pressão do fluido durante o processo de separação, de 50 psi para próximo de 40, aumentou a sobrevivência dos gametas enquanto manteve a acurácia na separação das células com os cromossomos X e Y (SUH e SCHENK, 2003). O uso de uma pressão mais baixa pode minimizar os danos causados à célula, mas também pode não ser suficiente para levar a

orientação de gametas de espécies que apresentam espermatozóides com cabeças arredondadas ou angulares (GARNER, 2006).

Sabe-se assim que, durante o processo de separação, a célula espermática é exposta a vários tipos de estresses (mecânicos e químicos) que podem causar-lhe danos (SCHENK *et al.*, 1999; SEIDEL, 2003a) que resultam em baixa capacidade fertilizante após a inseminação artificial (SARTORI *et al.*, 2004) e baixa taxa de desenvolvimento embrionário na produção *in vitro*, comparando-se com a utilização do sêmen não sexado (ZHANG *et al.*, 2003).

Recentemente, entre as várias mudanças ocorridas durante o processo de separação, a diminuição da pressão resultou e em uma diminuição considerável nos danos ocorridos nas células (SEIDEL *et al.*, 2003; SUH e SCHENCK, 2003). Esse procedimento, aliado a novas mudanças no processo de congelamento (ARAV *et al.*, 2002), pode levar a uma taxa de fertilidade igual a 90% da fertilidade do sêmen convencional, quando utilizado com um manejo adequado das fêmeas (SEIDEL, 2003b).

2.2 Criopreservação de sêmen

A moderna indústria bovina em todo o mundo é baseada na utilização da inseminação artificial (I.A.) com sêmen congelado (AIRES, *et al.*, 2003). O objetivo da criopreservação do sêmen é produzir um banco de células que podem ser utilizadas como uma importante ferramenta de distribuição genética. Entretanto, vários compartimentos bioquímicos e anatômicos da célula espermática (acrossomo, núcleo, mitocôndria, axonema e membrana plasmática) podem ser alterados durante o processo de criopreservação. Conseqüentemente o primeiro objetivo de um protocolo de congelamento, é prevenir a formação de cristais intracelulares e reduzir os danos ocorridos nas membranas durante e após a criopreservação (AMIRAT *et al.*, 2004).

O sucesso na concepção e nos benefícios econômicos na I.A. depende da viabilidade do sêmen criopreservado para fertilização do ovócito (WATSON, 1999). Suarez (1998) afirmou que em torno de 50% dos espermatozóides em amostras normais são lesados durante os processos de criopreservação, e conseqüentemente há necessidade de se utilizar um maior número de

espermatozóides na inseminação com sêmen congelado quando comparado a amostras de sêmen fresco.

O diluidor e o crioprotetor são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides dos choques térmico e osmótico que ocorrem durante o processo de congelação, já que esse processo pode causar aos espermatozóides danos irreversíveis que afetam a estrutura físico-química da célula, principalmente à membrana, ao acrossoma e ao metabolismo para produção de energia, diminuindo a motilidade progressiva (PICKETT *et al.*, 1987), afetando assim, o tempo de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea (VALCARCELL *et al.*, 1996). Os diluidores utilizados na preservação de sêmen das espécies domésticas normalmente utilizam em sua composição a gema de ovo. O uso da gema de ovo é benéfico para a estocagem de sêmen a baixa temperatura, pois os lipídeos presentes nesse componente ajudam as células espermáticas a resistirem ao choque térmico (BOGART e MAYER, 1950; LASLEY *et al.*, 1942; PHILIPS, 1939).

2.2.1 Danos causados pela criopreservação

O estresse inicial, ao qual o espermatozóide é submetido, é o resfriamento de 37°C para 5°C. Se esse procedimento for realizado de forma inadequada, a célula passa por um fenômeno denominado “choque térmico” (WATSON, 1981), que é caracterizado por uma alteração no padrão de movimento da célula espermática; o movimento se torna circular ou até mesmo retrógrado e a célula rapidamente perde sua motilidade. Isto se deve a danos à membrana acrossômica e plasmática, à redução do metabolismo e à perda dos componentes intracelulares à medida que os espermatozóides se aproximam da fase de transição e no decorrer do resfriamento (SAMPER *et al.*, 1991).

Esses efeitos podem ser minimizados por um controle nas taxas de refrigeração entre as temperaturas críticas de 19°C a 8°C, para espermatozóides de eqüino (MORAN *et al.*, 1992) e/ou pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) no meio diluente.

O espermatozóide congela seu citoplasma a -1°C, embora a uma temperatura entre -6°C e -15°C, as células ainda não se encontram totalmente

congeladas, sendo denominadas de super-resfriadas mesmo quando o gelo extra-celular já se encontra presente (AMANN e PICKETT, 1987). Quando o gelo extra-celular se forma, há um aumento da temperatura do sistema, principalmente devido à pressão do vapor d'água super-resfriada em superar a do gelo; esse incremento de calor pode ser lesivo às células (AMANN e PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT *et al.*, 1992).

Esse aumento de temperatura pode ser minimizado quando uma curva de resfriamento adequada é empregada. Curvas de resfriamento demasiadamente rápidas, podem não levar a uma remoção adequada da água intra-celular, formando grandes cristais de gelo e trazendo danos ao complexo celular. Em contrapartida, taxas de refrigeração muito lentas levam a uma desidratação intensa do espermatozóide, que apresenta uma severa modificação estrutural de seu citoplasma, fazendo com que sua membrana se rompa por ação das forças mecânicas (MAZUR, 1984; AMANN e PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT *et al.*, 1992).

Em temperaturas entre -15°C e -6°C, os espermatozoides são relativamente inertes e podem ser mergulhados no nitrogênio líquido. Neste estágio as células têm pouca susceptibilidade aos danos induzidos pelas altas concentrações de sais, por estarem com seu metabolismo praticamente parado (SQUIRES e PICKETT, 1995).

2.2.2 Criopreservação de sêmen sexado

O sucesso da criopreservação do sêmen sexado foi o principal fator que possibilitou a comercialização na espécie bovina (SEIDEL *et al.*, 1999). Entretanto as células sexadas tendem a perder sua viabilidade mais rápido quando comparado a não sexadas (GARNER, 2006)

A sobrevivência do espermatozóide após o procedimento de separação é extremamente importante, e assim, a criopreservação e o estoque de sêmen sexado devem ser cuidadosamente re-examinados. O desenvolvimento de métodos de criopreservação assim como o uso de um sistema de congelação (Multi-Thermal Gradient) pode ser capaz de proteger melhor a célula fazendo com que apresente uma maior viabilidade na pós-descongelação (ARAV *et al.*, 2002b).

Mesmo que durante o processo de separação as células mortas e com danos sejam eliminadas, as células viáveis tendem a morrer rapidamente quando comparadas a células não sexadas principalmente de suínos e bovinos (RATH *et al.*, 2003a; RATH *et al.*, 2003b).

Amostras de sêmen criopreservados não sexado apresentam maior motilidade do que amostras de sêmen sexado (SCHENK *et al.*, 1999). Outros estudos mostram diferentes padrões de velocidade entre sêmen sexado e não sexado (KLINC *et al.*, 2004). Segundo Maxwell e Johnson (1997), amostras de sêmen sexado apresentam altas porcentagens de células com coloração pela clortetraciclina (CTC) comparado a amostras não sexadas, indicando modificações semelhantes a capacitação espermática, quando incubado por várias horas. Além disso, essas amostras apresentavam menores índices de espermatozóides vivos. Como resultado deste processo de capacitação prematura, espermatozóides sexados são liberados antes das monocamadas de células epiteliais do oviduto quando comparados a espermatozóides não sexados (HOLLINSHEAD *et al.*, 2003).

Quando doses com a mesma concentração de sêmen sexado e não sexado são comparadas, a fertilidade do sêmen não sexado é menor que a de doses convencionais utilizadas comercialmente, indicando que esses danos podem ser a causa da baixa fertilidade (SEIDEL e SCHENK, 2002). Daí a necessidade de novas metodologias e diluentes que promovam uma maior proteção na célula durante o processo de criopreservação para minimizar os danos causados durante o processo, já que a célula separada por citômetro de fluxo é mais fragilizada que a não separada.

2.3 Avaliação funcional e morfológica da célula espermática

2.3.1 Motilidade

Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozóide não esteja totalmente elucidada, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como principal parâmetro para avaliação do sêmen.

Convencionalmente, o principal teste para a qualidade do sêmen na maioria das centrais de IA e clínicas têm sido a estimativa da porcentagem de

células móveis e o vigor dessa motilidade. Embora comum, esse teste não é completamente confiável e nem apresenta repetibilidade (GRAHAM *et al.*, 1980), já que os procedimentos de manipulação do sêmen, a qualidade do microscópio e a experiência do avaliador podem causar projeções erradas da real qualidade de sêmen, sem contar que a análise dos diferentes tipos de motilidade fica defasada devido ao fato de ser impossível ao olho humano, mesmo com a ajuda do microscópio, analisar os espermatozóides individualmente.

Com a análise computadorizada do sêmen, pode-se padronizar a motilidade espermática de cada espécie e obter maior objetividade e repetibilidade (DAVIS e SIEMERS, 1995). Usando essa via de acesso, é possível relatar padrões de motilidade para demonstrar a fertilidade do sêmen (BUDWORTH *et al.*, 1988, ZHANG *et al.*, 1997).

A análise computadorizada do sêmen (CASA) mensura a qualidade da motilidade atribuídas ao espermatozóide e pode ser aplicada na rotina de análise de sêmen. A relação entre as mensurações de CASA e a fertilidade a campo tem sido reportada em várias espécies (BUDWORTH *et al.*, 1988; HOLT *et al.*,).

2.3.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve toda a célula espermática e mantém todas as organelas e componentes citoplasmáticos juntos: por ser semipermeável, retém os gradientes químicos, íons e outros solutos. Proteínas específicas da membrana facilitam o transporte de glicose e frutose do meio externo para dentro da célula (SCHURMANN *et al.*, 2002). Esses transportes são indispensáveis para o ganho de energia da célula, já que em uma célula madura, 90% de seu ATP são produzidos através de glicólise anaeróbica, o que indica a importância de substratos monossacarídeos (MUKAI e OKUNO, 2004; MARIN *et al.*, 2003). Assim, se a membrana plasmática não estiver intacta, o espermatozóide é considerado incapaz de fertilizar.

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído, e ainda seus componentes são segregados

dentro de regiões específicas e domínio, sendo eles: a cabeça, a peça intermediária e o flagelo (GADELLA, 2000). Assim, sua integridade é essencial para o metabolismo normal do espermatozóide, capacitação e reação acrossômica, podendo ser também usado para avaliar a viabilidade do espermatozóide (JANUSKAUSKAS *et al.*, 2000; GARNER *et al.*, 1997; REVELL e MRODE, 1994).

Para avaliar a membrana plasmática são comumente utilizadas colorações fluorescentes impermeáveis e/ou permeáveis quando a membrana está intacta e geralmente com afinidade pelo DNA (SILVA e GADELLA, 2006). Diferentes sondas fluorescentes podem ser usadas para este fim, com distinta excitação (ex) e emissão (em), tais como HOESCHT 33258 (ex/em de 358/488 nm comprimento de onda) (MCLAUGHLIN *et al.*, 1992), YoPro1 (ex/em de 488/515 nm comprimento de onda) (HARRISON *et al.*, 1996), iodeto de propídio (ex/em de 488/>620 nm comprimento de onda) (PINTADO *et al.*, 2000), entre outras inúmeras colorações.

O IP (iodeto de propídio) possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GARNER *et al.*, 1988). A aplicação dessa coloração, associada a outras, para avaliar a integridade de membrana em sêmen bovino, é extensamente utilizada (ZUCCARI *et al.*, 1995 e 1997; AML *et al.*, 2001; ARRUDA *et al.*, 2003)

Corantes supravitais, como HOECHST 33342, também têm sido utilizados em associação para avaliação de integridade de membrana. Esse corante se liga especificamente ao DNA da célula quando esta se encontra íntegra, marcando a célula em azul, tanto que também é utilizado para o procedimento de separação de células espermáticas (MAXWELL *et al.*, 1997)

2.3.3 Acrossomo

O acrossomo é derivado do complexo de Golgi sendo composto por enzimas hidrolíticas organizadas em um tipo de matriz (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2002). A ligação do espermatozóide com a zona pelúcida provocará a reação acrossômica resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais. Isto junto com a hiperativação da motilidade ajudará o espermatozóide a penetrar a zona pelúcida (HONDA *et al.*, 2002). Assim o

acrossomo deve permanecer intacto antes e durante a passagem pelo istmo até ocorrer a ligação com a zona pelúcida. Quando a reação acrossômica ocorrer antes do previsto pode-se ter uma queda na fertilidade do sêmen (SILVA e GADELLA, 2006)

A integridade acrossomal é comumente avaliada através do uso de lecitina conjugada com sondas fluorescentes. A lecitina se liga a glicoproteínas que são exclusivamente localizados no acrossomo (SILVA e GADELLA, 2006). Dependendo da espécie, a lecitina mais utilizada é *Pisum sativum* (PSA) ou *Arachis hypogae* (PNA). Estas lecitinas podem ser conjugadas a sondas fluorescentes como FITC (ex/em 488/515 nm comprimento de onda) (SAZSZ *et al.*, 2000) ou ainda ao PE (NAGY *et al.*, 2003). A detecção pode ser realizada com células vivas: a ausência de fluorescência indica acrossomo intacto e a fluorescência verde indica lesão de acrossomo ou reação acrossômica.

A avaliação dos espermatozóides através de lecitinas, como a aglutinina *Pisum sativum* (PSA) e *Arachis hypogea* (PNA) conjugadas a fluorocromos (FITC), que se ligam nos terminais de glicoproteínas, α D glicose e α D manose especificamente ao açúcar α D manosidase encontrado no conteúdo acrossomal, tem sido utilizadas na avaliação acrossomal de diferentes espécies (CROSS *et al.*, 1986). O FITC-PSA tem sido utilizado para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas eqüinas a fresco ou submetidas a crioinjúria (ARRUDA *et al.*, 2003)

2.3.4 Mitocôndria

A mitocôndria espermática é localizada na peça intermediária. Ela é a responsável pela produção de ATP através de fosforilação oxidativa que serve como suplemento energético para os batimentos flagelares (COSSON, 1996). Além disso, também é responsável pela produção de ATP para a manutenção celular requerida tanto pela cabeça quanto pelo flagelo. O ATP é importante, entre outros, para o processo de manutenção da bomba de Na^+ e K^+ já que esta está envolvida na regulação química e no transporte de gradientes eletrolíticos. Assim a integridade funcional da mitocôndria é um aspecto importante para a sobrevivência da célula no trato reprodutivo da fêmea durante as técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

Existem inúmeras sondas fluorescentes indicadoras do potencial mitocondrial. Entre elas podemos citar as rodaminas e as carbocianinas (CELEGHINI, 2005). O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem acusarem toxicidade (REERS *et al.*, 1991).

A sonda mitocondrial 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-iodeto carbocianina (JC-1) não apenas identifica mitocôndrias com baixo potencial emitindo uma fluorescência verde (510-520 nm), mas também diferencia estas daquelas com alto potencial. Esta discriminação ocorre porque as formas de JC1 se agregam a altos potenciais de membrana e estes J-agregados emitem fluorescência vermelho-laranja (590 nm) (GARNER e THOMAS, 1999).

Outra sonda comumente utilizada é a rodamina (R123) e tanto ela como o MITO resultam numa coloração de intensidade de verde diferenciando populações com alto e baixo potencial. Em contraste, a coloração com JC1 produz duas populações (verde ou laranja) dependendo do seu potencial. Esta habilidade de discriminar potenciais de membrana em alto (laranja) e baixo (verde) promove uma rigorosa estimativa da função metabólica (GARNER *et al.*, 1997).

Celeghini (2005) utilizando rodamina, mito tracker green FM, CMXRos e JC-1 para avaliação de potencial de membrana mitocondrial através de microscópio de epifluorescência, afirmou que apesar de todos serem bons indicadores de potencial, o JC-1 se destacou por poder identificar duas populações, uma com alto potencial e outra com baixo.

2.3.5 Associação de sondas fluorescentes

Inúmeras sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas para conseguir informações sobre as funções celulares dos espermatozóides, as quais podem estar relacionadas com a fertilidade. Ainda podem ser usadas combinações de diversas sondas fluorescentes para avaliar diferentes características funcionais, aumentando a probabilidade de estas características refletirem a capacidade fecundante dos espermatozóides (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002).

A possibilidade de associar sondas fluorescentes para a avaliação simultânea de várias estruturas da célula espermática é bem descrita na literatura (ARRUDA *et al.*, 2003; NAGY *et al.*, 2003).

Esses testes são importantes para a obtenção de técnicas que apresentem resultados condizentes com o verdadeiro status de cada estrutura e alta repetibilidade. Mas ainda é imprescindível identificar sondas que melhor se associam, pois certas sondas quando associadas a outras podem apresentar resultados variados, alterando suas características e seus padrões de fluorescência (CELEGHINI, 2005).

A avaliação simultânea de integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pode ser realizada por técnicas simples e de alta repetibilidade pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, sendo que o JC-1 utilizado para potencial de mitocôndria é capaz de separar as células em duas populações, diferentemente da associação com MITO e CMXRos (CELEGHINI, 2005).

2.4 O uso do sêmen sexado

O mais importante a ressaltar é que os bezerros nascidos a partir de sêmen sexado são normais. A população de bezerros e bezerras resultante desta nova biotecnologia não apresenta diferença daqueles nascidos de sêmen convencional. Em resultados a campo não foi apresentada diferença de tempo de gestação, peso ao nascer, natimorto e ganho de peso (TUBMAN *et al.*, 2003).

O uso desta biotécnica contribui para uma maior pressão de seleção junto a programas de melhoramento genético e, dentre as possibilidades de sua aplicação, as relacionadas com a produção de embriões são as que apresentam maior potencial. A seleção do sexo da progênie em rebanhos de leite e carne pode contribuir para um grande incremento no sistema de produção, com o direcionamento do nascimento de animais para o sexo desejado (DELL' AQUA JUNIOR *et al.*, 2006).

A seleção do sexo tem um valor econômico significativo na pecuária de leite e de corte, em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie

de um dos sexos (RUVUNA *et al.*, 1992; HOHENBOKEN, 1999). Em programas de melhoramento genético, a sexagem de espermatozóides associada à inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) incrementará o melhoramento genético animal pelo aumento do progresso genético anual em até 25% para produção de leite e de carne (HOHENBOKEN, 1999).

A utilização do sêmen sexado poderá contribuir para o aumento da rentabilidade na produção animal (SEIDEL e JOHNSON, 1999) devido à possibilidade de se produzir descendentes com o sexo desejado visando à vantagem da diferença de características entre machos e fêmeas para mercados específicos (RORIE, 1999). Sua aplicação em testes de progênie pode reduzir os custos inerentes a esse programa, devido ao direcionamento do sexo dos animais nascidos, diminuindo o número convencional de inseminações hoje efetuadas (HOHENBOKEN, 1999).

3. OBJETIVOS

Para que a sexagem espermática tenha sucesso em sua aplicação comercial é necessário o desenvolvimento de técnicas de congelamento do sêmen sexado que levem a uma melhora dos resultados obtidos. Assim, o objetivo geral deste experimento desenvolver melhores procedimentos para a congelamento de sêmen sexado bovino de forma a contribuir para o avanço desta biotecnologia na espécie bovina. Para tanto, foi:

1. Verificado o efeito de diferentes metodologias na congelamento de sêmen sexado bovino de forma a contribuir para o avanço desta biotecnologia nesta espécie;
2. Verificado o efeito de dois diluentes na congelabilidade do sêmen sexado de bovinos;
3. Avaliada a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen sexado bovino com diferentes meios diluidores, por meio da análise computadorizada do movimento (CASA), integridade de membranas e função mitocondrial;
4. Avaliada a fertilidade *in vitro* entre os dois diluentes de acordo com a metodologia escolhida;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas. A congelação do sêmen foi realizada na Sexing Technologies do Brasil, localizada junto à Lagoa da Serra no município de Sertãozinho. E a análise laboratorial junto à área de Reprodução Animal do Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP – Botucatu, SP.

4.2 Touros

Foram utilizados 10 touros de diferentes raças e em idade reprodutiva, e o procedimento de colheita do sêmen foi realizado com vagina artificial. Após a colheita do ejaculado a concentração espermática foi determinada através de um espectrofotômetro (densímetro, Animal Reproduction Systems, model 5348, mod 1 - DUPREE®, Chino, Califórnia). A motilidade total e progressiva (aumento de 10X) e a morfologia espermática (aumento de 100X) foram avaliadas subjetivamente através de microscópio OLYMPUS AX70 (Olympus True Research System Microscoper model AX70, Melville, Nova York). Apenas ejaculados com concentração superior a 1500×10^6 /mL, 80% de motilidade total, 60% de motilidade progressiva e com menos de 20% de defeitos totais foram utilizados.

4.3 Separação por citometria de fluxo

A separação das células espermáticas foi realizada em quatro máquinas MoFlo® SX (Cytomation Inc., Fort Collins, EUA) equipadas com laser de argônio, detectores de fluorescência e uma agulha desenvolvida para dar orientação ao espermatozóide (RENS *et al.*, 1999). Foi utilizada uma pressão de 40psi (SUH *et al.*, 2005)

Para isso uma alíquota de sêmen fresco foi diluída em uma concentração de 200×10^6 /mL em meio para a coloração, constituído de maio

TALP modificado (meio Tyrode com albumina, lactato e piruvato) com HOESCHT 33342 por 45 minutos a 35°C protegido da luz. Após este período foi adicionada a amostra meio TALP acrescido de 4% de gema de ovo e um corante comestível vermelho (FD&C #40 Power, Warner Jenkinson Company Inc., St Louis, MO, EUA) para demarcar as células com ruptura de membrana (SEIDEL e GARNER, 2002; SCHENCK *et al.*, 1999), formando uma solução final de 4 mL cm uma concentração de 100×10^6 células /mLL

Durante a separação, em temperatura ambiente, as células foram misturadas com um meio específico à base de TRIS, ácido cítrico e frutose. As células mostram fluorescência quando são excitadas pelo laser argônio e passam por dois detectores: um para dar orientação correta e outro para medir a força de fluorescência. Assim, de acordo com a intensidade de fluorescência emitida é dada uma carga elétrica na célula (espermatozóides com cromossomo X recebem carga negativa por isso são atraídos pelo campo positivo e vice-versa para células com cromossomo Y), enquanto que células com ruptura de membranas coradas pela coloração vermelha e aquelas que não são orientadas de forma correta não recebem estimulação elétrica e são descartadas (SEIDEL e GARNER, 2002).

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Primeira Etapa: Fase experimental

Cada subgrupo foi formado por: TRIS: diluente TRIS-gema de ovo - Sexing Technologies, Navasota, EUA; e BB: diluente Botu-Bov® - Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil; como demonstrado na Figura 1.

4.4.1.1 GRUPO I (divido em 2 subgrupos de acordo com o meio diluidor: TRIS e Botu-Bov®)

As células separadas pelo citômetro foram coletadas em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 2,5 mL de uma solução com meio diluidor respectivo sem glicerol diluído com a adição de 16% de água, chamado de meio *catch*; até o volume de 15 mL e colocadas em refrigeração a 5°C por no mínimo 90 minutos.

Após este período de refrigeração adicionou-se ao sêmen o meio respectivo para cada grupo (TRIS e BB) contendo glicerol em duas etapas, ou seja, primeiro metade do volume (7,5 mL) e depois de 15 minutos a outra metade. Então o sêmen foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL® RC-4 – Heareus Sorvall Revco, Asheville, NC) a 800 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi homogeneizado e uma amostra foi retirada para a determinação da concentração e motilidade pós-separação. A concentração foi ajustada para 20×10^6 espermatozoides/mL e então envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV, Aigle, França) congeladas em nitrogênio líquido até posterior análise. Apenas sêmen com no mínimo 55% de motilidade pós-separação foi utilizado.

4.4.1.2 GRUPO II (meio TRIS e Botu-Bov®)

As células separadas pelo citômetro foram coletadas em tubos de centrífuga de 50 mL, contendo 2,5 mL de meio diluidor respectivo com glicerol até o volume de 15 mL e colocadas em refrigeração a 5°C por no mínimo 90 minutos.

Após este período de refrigeração adicionou-se ao sêmen 2,5 mL do meio sem glicerol respectivo para cada grupo (TRIS e BB) mais a diferença do volume total de meio contendo glicerol, em duas etapas: primeiro 6,25 mL e depois de 15 min, mais 6,25 mL. Então o sêmen foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL® RC-4 – Heareus Sorvall Revco, Asheville, NC) a 800 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi homogeneizado, sendo retirada uma amostra para a determinação da concentração e motilidade pós-separação. A concentração foi ajustada para 20×10^6 espermatozoides/mL e então envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV, Aigle, França) congeladas em nitrogênio líquido até posterior análise. Apenas sêmen com no mínimo 55% de motilidade pós-separação foi utilizado.

4.4.1.3 GRUPO III (meio TRIS e Botu-Bov®)

As células separadas pelo citômetro foram coletadas em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 2,5 mL de uma solução com meio diluidor respectivo sem glicerol diluído com a adição de 16% de água, chamado de meio *catch*; até o volume de 15 mL e colocadas em refrigeração a 18°C.

Então, adicionou-se ao sêmen o meio respectivo para cada grupo (TRIS e BB) contendo glicerol em duas etapas, ou seja, primeiro metade do volume (7,5 mL) e após 15 minutos a outra metade. Então o sêmen foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada a 18°C (SORVALL® RC-4 – Heareus Sorvall Revco, Asheville, NC) a 800 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi homogeneizado e retirado uma amostra para a derminação da concentração e motilidade pós-separação. A concentração foi ajustada para 20×10^6 espermatozóides/mL, envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV, Aigle, França), refrigeradas a 5°C por no mínimo 3 horas e congeladas em nitrogênio líquido até posterior análise. Apenas sêmen com no mínimo 55% de motilidade pós-separação foi utilizado.

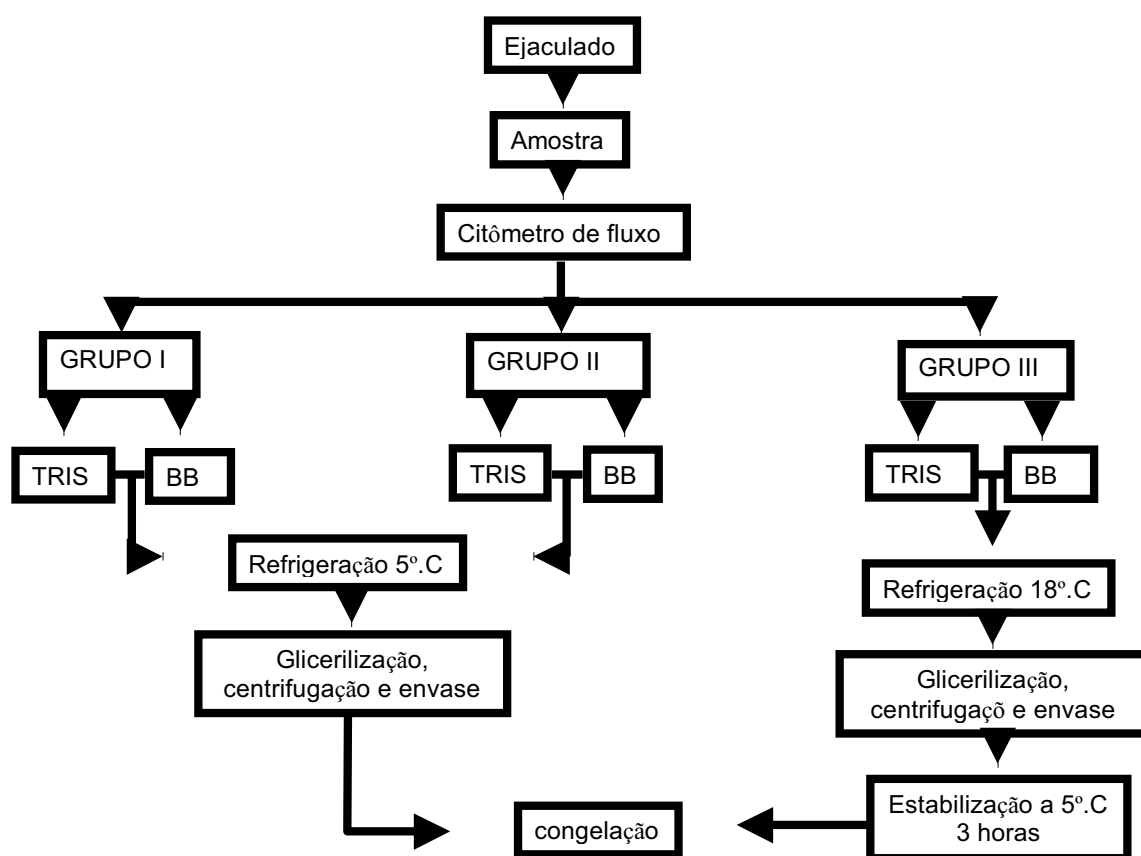


Figura 1 – Delineamento experimental

4.4.2 Segunda Etapa: Análise do sêmen

O sêmen foi descongelado em banho-maria a temperatura de 37°C por 30 segundos e então colocados em criotubos tipo eppendorf e mantidos em banho-maria-seco a 35-36°C durante a análise de motilidade

4.4.3 Análise computadorizada do sêmen

Uma amostra do sêmen foi colocada na câmara de MACLER e analisada ao HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retilineariedade (STR), lineariedade (LIN), amplitude de batimento de cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF) e porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP). Os dados foram arquivados em CD para análise estatística.

4.4.4 Análise morfológica através de sondas fluorescentes

Para a avaliação morfológica foi utilizada metodologia descrita por Celeghini (2005). Através de associações de sondas fluorescentes averiguou-se integridade de membrana plasmática (IMP), acrossomal (IMA) e alta função mitocondrial (AFM). Para isto foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (28,707-5, Sigma) para integridade de membrana plasmática, FITC-PSA (L-0770, Sigma) para integridade de membrana acrossomal e JC-1 (T3168, Molécula Probes) para função mitocondrial. Classificados de acordo com a Figura 2.

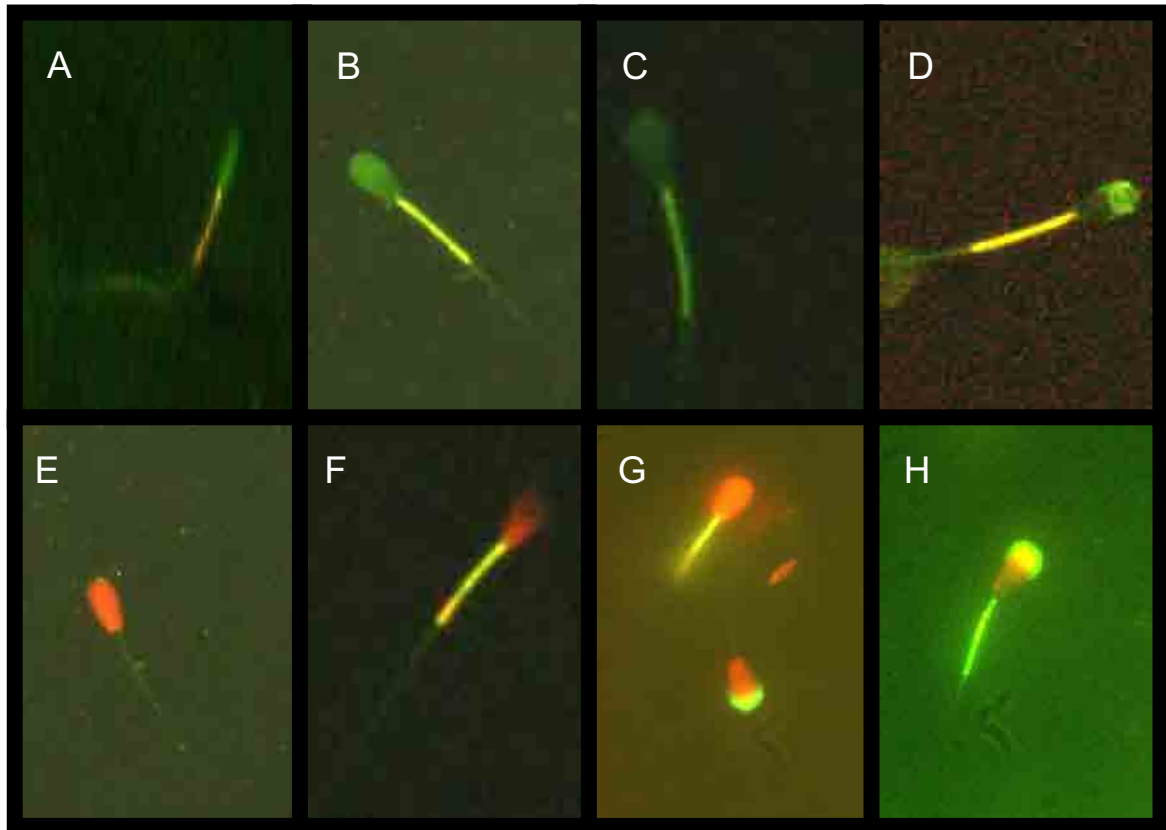


Figura 2 – Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação de sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005) aumento de 1000x. A e B representam células espermáticas com membrana celular e acrossomal íntegras e alta função mitocondrial. C representa célula com membranas plasmática e acrossomal intacta com baixa função mitocondrial. D representa célula com membrana celular intacta, membrana acrossomal lesada e alta função mitocondrial. E representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e baixa função mitocondrial. F representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial. G representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial (superior), célula com membrana celular e acrossomal lesadas com baixa função mitocondrial. H representa célula com membranas celular e acrossomal lesadas e alta função mitocondrial

4.5 Teste de fertilidade *in vitro*

Para o teste de fertilidade *in vitro* foi escolhido um único touro aleatoriamente e para o protocolo de refrigeração e congelamento foi escolhido o grupo 1 e comparado com o melhor resultado obtido entre os outros protocolos e meios diluidores. Após o processo de congelamento, uma palheta de cada grupo foi descongelada e analisada para averiguar motilidade e morfologia (IMP, IMA e APM). Apenas partidas com no mínimo 35% de MP foram utilizadas para a produção *in vitro* (PIV).

Dois laboratórios comerciais realizaram o teste de fertilidade, TECGEN, localizado no município de Lins e Laboratório de PIV Lagoa da Serra/Sexing Technologies do Brasil, localizado no município de Sertãozinho.

Os ovócitos bovinos foram aspirados de folículos antrais com 2 a 8 mm de diâmetro e mantidos no próprio fluido folicular, em placas de petri de 60 mm aquecidos à 35°C, até o momento da seleção e classificação sob microscópio estereoscópio. Foram selecionados para o uso somente ovócitos que apresentavam três ou mais camadas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico. Ovócitos com cumulus expandido, desnudos ou com citoplasma muito claro e alterações de formato foram descartados.

Após a seleção os ovócitos foram maturados em estufa a 38, 5° C, com 5% de CO₂ em ar e umidade absoluta, por 22 a 24 horas. Foi utilizado o meio TCM 199, sais de Earle e L-glutamina suplementado com 10% SFB, 2,2 mg/ml piruvato de sódio, 1mg/ml estradiol 17β (E₂ – Sigma, Saint Louis, EUA, # E 2758), 50µg/ml hCG (Profasi[®] 5.000UI), 5µg/ml FSH (Foltropin-V[®], Vetrepharm, Ontário, Canadá), e 50 µg/ml gentamicina.

Então, decorridas as horas da maturação, os ovócitos foram transferidos para gotas de 70 µL de meio de fertilização (Fert-Talp) acrescido de 0,6% de BSA FAF (Sigma 8806), 10 µg/mL heparina e PHE, cobertas com óleo mineral Sigma, previamente equilibrados por 2 horas em incubadora a 5% CO₂, 38,5°C e o máximo de umidade. Cada gota de fertilização continha 20 ovócitos maturados os quais foram transferidos em um volume máximo de 10 µl. Após a transferência dos ovócitos para as gotas de fertilização, as placas retornaram à incubadora, enquanto se realizava a seleção dos espermatozóides com Percoll.

Em um tubo de microcentrifuga com capacidade de 1,5 mL (*Eppendorf*), colocou-se 400 µL de gradiente Percoll 90% (*Nutricell*) e, sobre esta camada, mais 400 µL de gradiente Percoll 45% (*Nutricell*), vagarosamente, de maneira que as duas camadas não se misturassem. O tubo contendo as duas camadas de gradiente Percoll a 38,5°C foi aquecido antes de descongelar o sêmen.

O sêmen foi descongelado em banho-maria a 35°C por 20s. Após a descongelação, a palheta foi cortada com uma tesoura e o conteúdo da palheta depositado sobre as camadas de Percoll previamente aquecidas. O material (sêmen+ camada de percoll) foi centrifugado por 5 min com força de rotação de 9.000 x g (*Eppendorf 5415 C*) equivalente a 10.000 rpm.

Decorrido o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi retirado e desprezado, permanecendo um pellet de cerca de 100 uL. Ao pellet obtido, acrescentou-se 400 µL de meio de fertilização e uma nova centrifugação por 2-3 minutos, com a mesma força, foi realizada com o objetivo de retirar o Percoll. Após a segunda centrifugação, 400 µL do sobrenadante foram desprezados restando um pellet com volume final de 100 µL. Deste, 5 µL foi utilizado para medir a concentração (diluiu-se 5 µl de sêmen em 95 µl de água destilada) e 10 µL para verificar a motilidade após centrifugação em gradiente Percoll.

A concentração foi calculada utilizando-se um hemacitômetro (câmara de Neubauer). Contou-se a quantidade de células em 25 quadrados e a média foi calculada dividindo-se o número obtido por 5. Utilizou-se esta forma de calcular a concentração espermática devido ao baixo número de células utilizado no sêmen sexado quando comparado com o sêmen convencional (não sexado), evitando-se, assim, alta porcentagem de erro na contagem.

A concentração obtida foi multiplicada pela motilidade estimada, para descontar os espermatozóides imóveis. A partir desta concentração, calculou-se o volume de sêmen a ser utilizado para fertilizar uma gota de 100uL ($100/\text{concentração obtida} = \text{volume inseminante}$), onde 100 representa o volume da gota de fertilização. Desta forma a concentração final foi de 1.000.000 espermatozóides móveis/ 1mL de meio de fertilização.

A fertilização ocorreu em meio Fert-talp, onde os ovócitos e espermatozóides foram incubados em estufa, sob as mesmas condições, por aproximadamente 18 horas.

Decorridas 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados parcialmente (tiveram as células do *cumulus* parcialmente removidas) e transferidos para as placas de cultivo, onde foram co-cultivados na presença de suas próprias células do *cumulus* em meio de cultivo (CR2) acrescido de 40 ug/mL de gentamicina, durante sete dias, em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade absoluta. Após 72h de cultivo (D3), a taxa de clivagem foi determinada e o foi realizado o *feeding*. A produção de blastocistos foi determinada após 168h de cultivo (D7).

A porcentagem de clivagem e taxa de blastocistos foram calculadas a partir do número total inicial de ovócitos.

4.6 Análise estatística

Foi realizado o cálculo das médias (X) e desvio padrão (S) para todos os parâmetros avaliados. Análise de variância em blocos aleatórios. Contrastes entre médias pelo método Tukey para avaliação das amostras de sêmen e Qui-quadrado para o teste de fertilização *in vitro*, com nível de significância quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise laboratorial do sêmen

De acordo com os dados mostrados na tabela 1 não houve diferença estatística entre as metodologias testadas quando se utilizou o diluente Botu-Bov® (BB) tanto para a motilidade total (67,4%, 67,8% e 69,0%) quanto para a motilidade progressiva (45,5%, 45,3% e 45,9%). O mesmo ocorreu com a utilização do TRIS nos diferentes grupos, tanto para motilidade total (56,7%, 61,9%, 55,1%) quanto para motilidade progressiva (32,8%, 37,7%, 33,5%).

Em contrapartida, quando comparados os dois diluentes, observou-se que para os grupos GI, tanto para o TRIS (56,7%) quanto para o Botu-Bov® (67,4%), e do grupo GII, tanto para o Botu-Bov® (67,8%) quanto para o TRIS (61,9%), não apresentaram diferença estatística entre si, ainda que os valores para o diluente Botu-Bov® sejam superiores para a motilidade total (MT). O GIII (61,9%) utilizando o TRIS, apesar de não ter diferença estatística com o GI (56,7%) e GII (55,1%) também com TRIS, não apresentou diferença estatística com nenhum grupo utilizando Botu-Bov® em qualquer um dos tratamentos (67,4; 67,8 e 69,0% para GI, GII e GIII respectivamente). E, ainda os grupos GI e GII com TRIS apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) com todos os grupos onde foi utilizado o Botu-Bov®.

Quanto à motilidade progressiva (MP), ainda na tabela 1, observou-se que o único grupo que não apresentou diferença estatística em relação aos grupos com a utilização do Botu-Bov® (45,5%, 45,3% e 45,9%) foi o GII com TRIS (37,7%). E este grupo não apresentou diferença com o GI (32,8%) nem com o GIII (33,5%) ambos com TRIS, enquanto estes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos grupos com Botu-Bov® (45,5%, 45,3% e 45,9%).

Já em relação à percentagem de espermatozóides rápidos não ocorreram diferenças estatísticas, tanto em relação às diferentes metodologias quanto à utilização dos dois diluentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
MT	56,7 ^{bc}	67,4 ^{ab}	61,9 ^{bc}	67,8 ^{ab}	55,1 ^c	69,0 ^a
DP	13,96	8,77	13,26	9,94	16	12,38
MP	32,8 ^b	45,5 ^a	37,7 ^{ab}	45,3 ^a	33,5 ^b	45,9 ^a
DP	12,58	12,09	12,73	13,23	14,58	10,58
RAP	50,7	56,7	53,6	56,4	46,1	59,2
DP	15,17	15,13	16,89	15,1	18,89	16,09

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

A tabela 2 apresenta os dados relativos às velocidades avaliadas pelo CASA, velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilínea (VCL). Podemos observar que o TRIS apresentou valores mais altos em quase todas as velocidades analisadas em comparadas ao Botu-Bov®, mas estatisticamente, nos grupos GI e GIII para VAP e VSL, não se observou diferença estatística entre os diluentes (109,4 $\mu\text{m/s}$ contra 99,1 $\mu\text{m/s}$ para VAP no GI; 102,0 $\mu\text{m/s}$ contra 104,15 $\mu\text{m/s}$ para VAP no GIII e 89,7 $\mu\text{m/s}$ contra 83,3 $\mu\text{m/s}$ para VSL no GI; 82,3 $\mu\text{m/s}$ contra 87,6 $\mu\text{m/s}$ no GIII), já em relação a VCL ocorre diferença ($p < 0,05$), sendo os valores do TRIS (206,6 $\mu\text{m/s}$ e 183,0 $\mu\text{m/s}$, respectivamente GI e GIII) maiores que os valores do Botu-Bov® (157,3 $\mu\text{m/s}$ e 159,8 $\mu\text{m/s}$). O grupo GII apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em todas as velocidades quando se comparou os diluentes, sendo os valores do TRIS superiores aos valores do Botu-Bov® (113,2 $\mu\text{m/s}$, 90,5 $\mu\text{m/s}$, 194,2 $\mu\text{m/s}$ contra 95,4 $\mu\text{m/s}$, 80,9 $\mu\text{m/s}$, 150,6 $\mu\text{m/s}$, respectivamente).

Em relação as diferentes metodologias pode-se observar que não houve diferença quando se utilizou o diluente TRIS na velocidade VAP (109,4 $\mu\text{m/s}$, 113,2 $\mu\text{m/s}$ e 102,0 $\mu\text{m/s}$), VSL (89,7 $\mu\text{m/s}$, 90,5 $\mu\text{m/s}$ e 82,3) e VCL (206,6 $\mu\text{m/s}$, 194,2 $\mu\text{m/s}$ e 183,0 $\mu\text{m/s}$). O mesmo ocorreu para o diluente Botu-Bov®, VAP com 99,1 $\mu\text{m/s}$, 95,4 $\mu\text{m/s}$ e 104,15 $\mu\text{m/s}$, $\mu\text{m/s}$, VSL com 83,3 $\mu\text{m/s}$, 80,9 $\mu\text{m/s}$ e 87,6 $\mu\text{m/s}$, e, VCL com 156,3 $\mu\text{m/s}$, 150,6 $\mu\text{m/s}$ e 159,8 $\mu\text{m/s}$, respectivamente GI, GII e GIII.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
VAP	109,4 ^{ab}	99,1 ^{ab}	113,2 ^a	95,4 ^b	102,0 ^{ab}	104,15 ^{ab}
DP	27,04	11,67	11,7	13,57	16,04	15,77
VSL	89,7 ^a	83,3 ^{ab}	90,5 ^a	80,9 ^b	82,3 ^{ab}	87,6 ^{ab}
DP	10,38	8,73	7,18	8,3	10,7	9,2
VCL	206,6 ^a	157,3 ^b	194,2 ^a	150,6 ^b	183,0 ^a	159,8 ^b
DP	32,93	27,25	27,06	28,99	33,45	32,25

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

Os dados observados na tabela 3 mostram diferença estatística entre os valores de ALH (deslocamento lateral de cabeça do espermatozóide) para a utilização dos diluentes sendo que o TRIS apresentou maiores valores de ALH para todos os grupos, respectivamente GI, GII e GIII, 8,0 μm , 7,8 μm e 7,7 μm quando comparados ao Botu-Bov®, 5,9 μm , 5,9 μm e 6,3 μm . Já em relação às diferentes metodologias não houve diferença estatística tanto para o TRIS (8,0 μm , 7,8 μm e 7,7 μm) quanto para o Botu-Bov® (5,9 μm , 5,9 μm e 6,3 μm para).

Ainda na tabela 3, os valores de BCF (Frequência de batimentos da cauda do espermatozóide, medida em Hz) não apresentaram diferença estatística nem entre os diluentes nem entre as metodologias testadas.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: deslocamento lateral de cabeção (ALH) e frequência de batimento de cauda (BCF) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
ALH	8,0 ^a	5,9 ^b	7,8 ^a	5,9 ^b	7,7 ^a	6,3 ^b
DP	1,36	1,09	1,2	1,07	1,17	1,41
BCF	24,3	25	24,2	25,5	24,7	24,9
DP	3,37	4,33	3,64	4,54	3,15	3,74

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

Na tabela 4 observou-se que os valores de STR (retilinearidade) mostram que não ocorreu diferença estatística entre as metodologias, tanto para o Botu-Bov® (85,1%, 85,6% e 85,5%, respectivamente GI, GII e GIII) quanto para o TRIS (79,8%, 80,6% e 81,8% para GI, GII e GIII respectivamente). Já em relação aos diluentes, o GII com o diluente GII (80,6%) foi equivalente ao GI com o Botu-Bov® (85,1%) e também ao GI (79,8%) e GIII (81,8%) com TRIS, mas diferiu dos valores de GII (85,6%) e GIII (85,5%) com Botu-Bov®.

Para LIN (linearidade), não houve diferença estatística em relação as metodologias tanto para o TRIS (45,6%, 48,6% e 47,5%) quanto pra o Botu-Bov® (57,4%, 57,7% e 57,2%), mas observou-se diferença ($p < 0,05$) entre os diluentes para todos os grupos, sendo que o Botu-Bov® apresentou valores superiores em todos os grupos (57,4%, 57,7% e 57,2%) quando comparado ao TRIS (45,6%, 48,6% e 47,5%).

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
STR	79,8 ^c	85,1 ^{ab}	80,6 ^{bc}	85,6 ^a	81,8 ^c	85,5 ^a
DP	5,24	5,03	6,08	4,66	4,65	5,46
LIN	45,6 ^b	57,4 ^a	48,6 ^b	57,7 ^a	47,5 ^b	57,2 ^a
DP	5,44	8,22	5,78	7,61	5,15	8,14

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

Os resultados de alongação e área são apresentados na Tabela 5. Os valores de alongação não diferem estatisticamente entre as metodologias, respectivamente, GI, GII e GIII, 43,9 μm , 42,4 μm e 43 μm para os grupos onde se utilizou o diluente TRIS e 42,7 μm , 43 μm , 43,1 μm para os grupos onde se utilizou Botu-Bov®, nem entre os diluentes.

O mesmo ocorreu para os valores de área onde os valores respectivamente, GI, GII e GIII para TRIS são 5,9 μm^2 , 5,8 μm^2 e 6,2 μm^2 e para o Botu-Bov® são 5,7 μm^2 , 5,5 μm^2 e 5,6 μm^2 .

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: alongação (ELONG - μm) e área (μm^2) analisados pelo CASA de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
ELONG	43,9	42,7	42,4	43	43	43,1
DP	2,74	3,08	2,72	2,6	3,13	2,97
AREA	5,9	5,7	5,8	5,5	6,2	5,6
DP	1,22	1,07	1,31	1,08	1,34	1,13

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

Os valores de percentuais de membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial são apresentados na tabela 6. Para os valores de integridade de membrana plasmática observou-se que para o diluentes TRIS ocorreu diferença estatística ($p < 0,05$) para o grupo GII (34,7%) em relação aos demais GI (39,4%) e GIII (41,6%). Diferente do que ocorreu com o grupo Botu-Bov® que apresentou diferença entre os grupos (50,1%, 46,7% e 48,7%, respectivamente GI, GII e GIII). Em relação aos diluentes pode-se observar que todos os grupos com Botu-Bov® (50,1%, 46,7% e 48,7%) diferiram estatisticamente dos grupos onde utilizou-se o TRIS (39,4%, 34,7% e 41,6%).

Os percentuais de acrossomo intacto não apresentaram diferença em relação as metodologias GI, GII e GIII tanto para o Botu-Bov® (85,3%, 85% e 84,6%) quanto para o TRIS (71,2%, 70,8% e 73,1%). Em contrapartida, ocorreu diferença quando se compararam os diluentes, sendo os valores superiores apresentados pelo Botu-Bov® (85,3%, 85% e 84,6%) contra o TRIS (71,2%, 70,8% e 73,1%).

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros espermáticos: integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e alta potencial mitocondrial (APM) analisados através de associação de sondas fluorescentes de 20 doses de sêmen comercial sexado comercial.

	GI		GII		GIII	
	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²	TRIS ¹	BB ²
IMP	39,4 ^b	50,1 ^a	34,7 ^c	46,7 ^a	41,6 ^b	48,7 ^a
DP	10,48	7,31	6,57	8,14	6,07	5,79
IMA	71,2 ^b	85,3 ^a	70,8 ^b	85 ^a	73,1 ^b	84,6 ^a
DP	9,77	4,93	8,64	5,71	8,98	6,12
APM	62,6 ^a	15,2 ^c	51,1 ^{ab}	17,8 ^c	47,5 ^b	14,1 ^c
DP	20,59	7,94	19,46	9,96	13,89	9,92

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

GI (grupo 1): Controle, refrigeração a 5°C.

GII (grupo 2): Utilização de glicerol para refrigeração a 5°C.

GIII (grupo 3): Refrigeração a 18°C.

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

Os valores de porcentagem de alto potencial mitocondrial não apresentaram diferença entre as metodologias quando se utilizou o diluente Botu-Bov® (15,2% 17,8% e 14,1%, respectivamente GI, GII e GIII). Entretanto, em relação ao diluente TRIS, ocorreu diferença entre os grupos GI (62,6%) e GIII (47,5%); o grupo GII (51,1%) não diferiu de nenhum dos dois grupos. Em compensação em relação aos diferentes diluentes ocorreu diferença estatística significativa, sendo o TRIS (62,6%, 51,1% e 47,5%) superior ao Botu-Bov® (15,2% 17,8% e 14,1% para GI, GII e GIII respectivamente).

5.2 Análise *in vitro* da fertilidade do sêmen

De acordo com os dados mostrados na tabela 7, pode-se observar que a taxa de clivagem com sêmen sexado foi semelhante ao do convencional (82,0%) quando se utilizou tanto o diluente Botu-Bov® (80,0%) quanto o TRIS (67,7%). Mas em relação ao desenvolvimento embrionário houve diferença significativa entre o TRIS (19,9%) e o convencional (33,5%) com $p < 0,05$. Já o Botu-Bov® (26,0%) não apresentou diferença em relação aos outros grupos.

Tabela 7 – Resultados de fertilização e produção de embriões *in vitro* de sêmen convencional (controle) e sexado com dois diferentes diluentes (Botu-Bov® e TRIS)

	No. De ovócitos	Clivagem (%) n (%)	Embriões n (%)
Sêmen convencional	128	105 (82%)	43 (33,5%) ^a
Sêmen sexado (TRIS)	226	153 (67,7%)	45 (19,9%) ^b
Sêmen sexado (BB)	203	163 (80,0%)	53 (26,6%) ^{ab}

Médias seguidas de diferentes letras, dentro de cada linha, diferem entre si pelo método de Qui-quadrado ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

Dados de 3 repetições

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

Além de uma maior taxa de produção de embriões pode-se observar uma melhor motilidade pós-percoll do diluente Botu-Bov® (70,0%) em relação ao TRIS (53,3%), e devido a isto também ocorreu um maior rendimento da palheta onde o Botu-Bov® pode em média fertilizar 9,1 gotas contendo 20 ovócitos contra apenas 6,3 gotas do TRIS.

Tabela 8 – Valores médios de motilidade pós percoll (%) e rendimento da palheta de acordo com o diluente utilizado.

	TRIS	BB
motilidade pós percoll	53,3	70
*rendimento (no. de gotas)	6,3	9,1

* numero de gotas possíveis para se fazer fertilização com uma concentração de 100.000/mL para cada 20 ovócitos.

Dados de 3 repetições

1 TRIS-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA)

2 Botu-Bov® (Biotech Botucatu, Botucatu, Brasil)

6. DISCUSSÃO

No presente experimento foram avaliados os efeitos de diluidores e diferentes metodologias durante a criopreservação do sêmen sexado. Em relação aos diferentes métodos de congelação, as modificações efetuadas em comparação com a técnica comumente utilizada visaram a minimizar as alterações sofridas pelas membranas plasmática e acrossomal durante a criopreservação. Dois diluidores com composições distintas foram testados para verificar a influência dos diferentes componentes intrínsecos a cada um sobre os parâmetros espermáticos pós-descongelação.

6.1 Efeito da metodologia de congelação sobre os parâmetros espermáticos

A motilidade espermática é a metodologia mais utilizada para a avaliação do potencial de fertilidade de um ejaculado ou de uma amostra de sêmen descongelado. Utilizando-se a análise computadorizada é possível conseguir uma alta repetibilidade dos muitos critérios dos movimentos espermáticos e esta correlação sugere que a fertilidade de um touro, ou de uma amostra de sêmen, pode ser estimada através da qualidade do movimento do sêmen (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Durante a criopreservação as amostras de sêmen sofrem algumas injúrias e após a descongelação ocorre uma diminuição da motilidade (CELEGHINI, 2005). De acordo com os percentuais de motilidade total (MT) detectados pelo CASA para o Botu-Bov® (BB), não ocorreu diferença estatística para nenhum dos grupos, e o mesmo ocorreu em relação a motilidade progressiva (MP).

Em relação ao diluidor TRIS-gema de ovo (TRIS), também não foi observada diferença estatística, tanto para MT quanto para MP entre as metodologias estudadas. Mas pode-se observar uma superioridade numérica do GII. Neste grupo, apesar de não diferir estatisticamente em relação aos outros dois grupos, possivelmente, a presença do crioprotetor no *catch* (solução utilizada para manter as células espermáticas após a separação pelo

citômetro de fluxo) contribuiu para uma maior manutenção da movimentação espermática pós-descongelação.

Sabe-se que as lipoproteínas presentes na gema de ovo ajudam na proteção das membranas celulares durante a refrigeração, protegendo contra o choque térmico (AMIRAT *et al.*, 2004); e talvez os resultados apresentados pelo GII se devam ao fato de se ter utilizado de uma porcentagem de glicerol durante o início da refrigeração que supostamente poderia estar protegendo a membrana durante o processo de refrigeração.

O estresse inicial ao qual o espermatozóide é submetido é o resfriamento de 37°C a 5°C. Se esse procedimento for realizado de forma inadequada, a célula passa por um fenômeno denominado “choque térmico” (WATSON, 1981), o que é caracterizado por uma alteração no movimento da célula espermática; o movimento se torna circular ou até mesmo retrógrado, a célula rapidamente perde sua motilidade, ocorrem danos à membrana acrossômica e plasmática, redução do metabolismo e perda dos componentes intracelulares. Muitos desses danos são resultados de alterações da membrana plasmática à medida que os espermatozoides se aproximam da fase de transição e no decorrer do resfriamento (SAMPER *et al.*, 1991).

A velocidade curvilínea (VCL) é a média da velocidade medida ponto a ponto pela célula; a velocidade de trajeto (VAP) corresponde à média entre a VCL e a velocidade linear (VSL); e esta última corresponde à média de velocidade entre o ponto inicial do movimento da célula ao ponto final. Todas são medidas em micrometro por segundo (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Assim como na motilidade, também não ocorreu diferença em relação às velocidades entre os grupos do diluente TRIS e os grupos do diluente BB. O mesmo ocorreu para os outros parâmetros avaliados pelo CASA.

A diferença ocorreu apenas em relação a integridade de membrana plasmática, onde o GII (34,7%) do TRIS foi inferior ao grupo GIII (41,6%), mas não do GI (39,4%) do mesmo diluente. Os dados demonstrados pela análise computadorizada mostraram que o grupo GII, utilizando o diluente TRIS, foi numericamente melhor em alguns parâmetros, mas não mostraram diferença estatística. Em contrapartida, a análise morfológica através de sondas fluorescentes mostrou que a utilização de glicerol antes da refrigeração acabou sendo deletéria para as células.

As primeiras células sexadas entravam diretamente em contato com o meio contendo glicerol e o volume inicial apresentava uma concentração de 12%, o que ocasionou um choque osmótico. Nos grupos do diluente BB, apesar de não apresentarem diferença significativa, pode-se observar que o resultado do GII foi semelhante, sendo inferior aos demais (GI e GIII), reforçando a hipótese de choque osmótico. Ao completar 15 mL de volume final da concentração de glicerol diminuiu para 1,7% e possivelmente diminuiu a toxicidade para as células.

Já é bem conhecido que a concentração de glicerol apresenta um efeito na sobrevivência do espermatozóide e que para sêmen bovino concentrações acima de 10% são deletérias para as células (WATSON, 1979).

Apesar de alguns trabalhos mostrarem que uma curva de refrigeração rápida seja mais benéfica para a integridade de membrana plasmática, devido a uma menor formação de cristais intracelulares (SCHAFFER-SOMI *et al.*, 2006), neste trabalho não foi constatada diferença entre a curva de refrigeração comumente utilizada (GI) com uma mais rápida (GIII).

6.2 Efeito do diluidor de congelação sobre os parametros espermáticos

Hoje em dia é muito bem conhecido que para qualquer processo de criopreservação de sêmen ser bem sucedido, um dos principais objetivos é, com o uso de meios diluidores, prevenir a formação de cristais intracitoplasmáticos reduzindo assim as lesões ocorridas durante o processo de congelação e descongelação que poderiam levar à morte celular.

Os resultados apresentados sugerem que em todos os grupos avaliados o BB apresentou uma melhor condição para a manutenção da motilidade total e progressiva e assim obteve sempre um maior percentual de movimentação celular em todos os grupos quando comparado com o TRIS.

Celeghini (2005) verificou que o diluidor BB apresentou uma redução na motilidade total e progressiva de apenas 39,85% e 39,52% enquanto que outro diluidor (Bioxcell®) diminuiu 55,8% e 49,67%, respectivamente para as motilidades total e progressiva. Crespilho *et al.* (2006) utilizou tanto o diluidor BB quanto o TRIS e observou que o BB foi mais eficiente na criopreservação

de sêmen bovino processado em baixas doses. O mesmo foi verificado por Martins Jr *et al.* (2006) em relação à motilidade progressiva, sendo que o BB apresentou 60% contra 51,3% do diluidor TRIS.

Apenas no GII não ocorreu diferença estatística entre os diluidores, sendo que o resultado obtido com o TRIS (61,9% e 37,7%, respectivamente MT e MP) além de não apresentar diferença entre os grupos GI e GIII do TRIS não diferiu também de nenhum grupo onde foi utilizado BB.

O diluente TRIS apresentou valores mais altos para VAP e VSL do que o Botu-Bov®, mas para os grupos GI e GIII ocorreu diferença estatística apenas para o VCL. Este mesmo resultado foi observado em trabalho apresentado por Crespilho *et al.* (2006) com sêmen congelado convencional com baixa concentração. Em contrapartida Martins Jr. *et al.* (2006) encontrou diferença estatística para os valores de VAP e VCL e apesar de o VSL também ter sido maior para o TRIS, não ocorreu diferença comparada ao BB.

Em relação ao GII, onde se utilizou glicerol tanto para o BB quanto para o TRIS, observou-se diferença para todas as velocidades, sendo o TRIS sempre estatisticamente superior.

O deslocamento lateral de cabeça do espermatozóide (ALH) é um importante parâmetro que afeta diretamente os resultados da FIV (JEULIN *et al.*, 1996) e valores altos não são desejados, pois podem interferir na progressão da célula (ARRUDA, 2000).

O diluente TRIS mostrou valores estatisticamente altos de ALH quando comparado com o BB, e este mesmo resultado foi encontrado por Crespilho *et al.*, 2006. Verstegen *et al.* (2002) indicam que valores superiores a 7,0 µm aliados a altos valores de VCL em relação ao VSL caracterizam um movimento vigoroso e desordenado condizente com a hiperatividade.

A hiperatividade é caracterizada por um batimento flagelar assimétrico aliado a uma alta amplitude de cabeça, o que promove uma trajetória irregular e curva. Em contraste, um movimento considerado normal apresenta baixa amplitude, batimentos flagelares simétricos e uma trajetória progressiva (YANAGIMACHI, 1994).

Outro ponto em questão foi o resultado encontrado para retilineariedade (STR), que representa a relação dos valores de VSL/VAP estimado em porcentagem: o valor mais próximo de 100% corresponde a uma maior

retilineariedade de movimento. Neste aspecto, não ocorreu diferença entre as metodologias quando utilizado o mesmo diluente, mas houve diferença quando comparados os diluentes: o BB apresentou valores maiores, mais próximos de 100% (VERSTEGEN *et al.*, 2002), apresentando conseqüentemente um movimento mais uniforme e retilíneo. Isso pode ser justificado pelos baixos valores de ALH apresentados pelo BB.

Em relação à lineariedade (LIN), obtida através da relação de VSL/VCL, também em porcentagem, e que estima a capacidade das células de traçarem um trajeto em linha reta, é considerado bom um valor maior que 50% (VERSTEGEN *et al.*, 2002). Neste caso o diluente BB também se mostrou superior, pois em todos os grupos apresentou valores superiores que 50% enquanto o TRIS mostrou valores sempre inferiores.

Estes resultados estimados pelo CASA podem sugerir um padrão de motilidade diferente para cada diluente. Os padrões demonstrados pelo TRIS sugerem uma possível hiperativação dos espermatozóides devido aos altos valores da relação entre as velocidades (VAP, VSL e VCL), alto valor de ALH, e LIN e menor valor de STR.

Apesar de haver relação entre a capacitação e a hiperativação espermática, já foi demonstrado que uma pode ocorrer sem a outra em determinadas condições, já que são reguladas por diferentes eventos (HO e SUAREZ, 2001).

O processo de sexagem promove danos à célula (SHENCK *et al.*, 1999), deixando as células mais sensíveis ao processo de criopreservação e assim apresentam padrões de motilidade diferentes e alta porcentagem de coloração de clortetraciclina (CTC) quando comparadas com amostras de sêmen convencional (HOLLINSHEAD *et al.*, 2003). Apesar de este trabalho não comparar amostras de sêmen sexado com sêmen convencional, foi observado que o padrão de motilidade do diluente BB foi mais parecido com aqueles descritos na literatura para o sêmen convencional.

A avaliação simultânea das membranas plasmáticas, acrossomal e função mitocondrial também é uma das metodologias usadas para se obter mais informações sobre a qualidade das amostras do sêmen. Neste trabalho foi utilizada a associação proposta por Celeghini (2005).

Segundo os resultados pode-se observar que o BB obteve maior porcentagem de membrana plasmática íntegra e, sem apresentar diferença estatística entre as metodologias, o mesmo ocorreu com a membrana acrossomal. Quando comparado ao diluente TRIS, observou-se diferença estatística em relação ao BB, e isto pode ser associado com os achados da CASA, podendo-se supor que os componentes deste último diluidor agem protegendo melhor a célula durante o processo de congelação.

Outros autores também obtiveram estes achados em relação à membrana plasmática, quando compararam TRIS versus BB em sêmen convencional bovino, principalmente em doses de baixa concentração (CRESPILHO *et al.*, 2006 e MARTINS JR, *et al.*, 2006).

O percentual de acrossomo encontrado também condiz com outro estudo, que comparou o BB vs Bioexcel®, sendo que o primeiro obteve também uma maior porcentagem de acrossomos íntegros.

Segundo Ammann e Pickett (1987) as lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema do ovo são responsáveis pela proteção da membrana durante a criopreservação, e como ambos os diluentes apresentam gema de ovo em sua formulação, esses resultados sugerem que algum outro componente presente no diluente BB possa estar agindo de forma a proteger ainda mais as células.

Outro aspecto que indica a melhor proteção dos espermatozóides tratados com o BB é o percentual de células com baixo potencial de membrana mitocondrial. Nas células espermáticas as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares (COSSON, 1996). Entretanto, o gasto de ATP deve ser equilibrado para que o espermatozóide possa cumprir suas funções de transporte pelo trato reprodutivo feminino, colonização dos reservatórios espermáticos e fertilização. Neste experimento foi observada uma menor porcentagem de células com alto potencial de membrana nos grupos com o diluente BB em relação ao TRIS, apesar da motilidade superior encontrada.

É conhecido que a capacitação espermática leva a uma hiperpolarização das membranas espermáticas, incluindo a mitocondrial, devido ao aumento dos níveis de íons Ca^{++} (HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2006). A base molecular

do processo de capacitação espermática é a remoção de colesterol e alteração da distribuição dos fosfolípidos de membrana que resultam na abertura dos canais de Ca^{++} . Modificações semelhantes podem acontecer na crioinjúria levando à ocorrência de uma capacitação espermática pré-matura. Este processo não é desejável por diminuir a longevidade espermática. Desta forma o alto potencial de membrana mitocondrial encontrado nos grupos tratados com o diluente TRIS parece indicar que estes espermatozóides podem ter iniciado a capacitação espermática prematuramente. Estes dados são reforçados pelo padrão de movimento espermático nos grupos tratados com o TRIS, que apresentaram maior taxa de VAP, VSL, VCL e ALH. Segundo alguns autores, são índices que condizem com hiperativação (YANAGIMACHI, 1994; HO e SUAREZ, 2001; VERSTEGEN *et al.*, 2002),

Em contrapartida o diluente BB apresenta um padrão de motilidade com baixa amplitude lateral de cabeça, alta linearidade e uma trajetória mais próxima do movimento progressivo, segundo os valores de MP, ALH e LIN. Talvez por isto mostre um menor potencial de membrana mitocondrial quando comparado com os grupos TRIS. Celeghini (2005) também encontrou resultados semelhantes para o BB em relação ao Bioexcel®.

Pode-se, pois afirmar, levando em consideração a percentagem de espermatozóides móveis, que o meio diluidor BB apresentou em sua fórmula componentes que protegem de forma mais segura as células durante o processo de congelação e descongelação. No entanto, maiores estudos precisam ser realizados para comprovar o efeito benéfico da adição do BB como diluidor de sêmen bovino sexado, visando à confirmação dos resultados em testes de fertilidade *in vivo* e *in vitro*.

6.3 Efeito do diluidor na produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* (PIV) utilizando sêmen convencional gera um grande número de embriões do sexo indesejado. Desta forma a obtenção de bons resultados na PIV utilizando sêmen sexado contribui para a determinação do sexo dos embriões com grande índice de acerto, maximizando os recursos utilizados com esta biotécnica (DELL'AQUA JR, *et al.*, 2006).

Entretanto, a utilização do sêmen sexado em programas de PIV, tem ocasionado grande variação na geração de embriões viáveis para transferência. Estudos recentes comparam a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo com a utilização de sêmen convencional (não sexado) em relação à produção *in vitro* de embriões bovinos em programas comerciais (CRAN *et al.*, 1995; LU *et al.*, 1999).

Os dados de clivagem sugerem que tanto o BB (80,0%) quanto o TRIS (67,7%) não apresentaram diferença entre si, nem referente ao controle (82,0%). Esse resultado difere de outros estudos em maior escala que mostraram que a clivagem do sêmen convencional fresco (76%) é maior que a sêmen sexado fresco (66%) (LU *et al.*, 1999). Nesses estudos, não foi observada diferença na taxa de clivagem entre o sêmen sexado fresco e o convencional congelado; foi relatado que a taxa de blastocisto para o grupo de sexado fresco foi 70% semelhante à produção do convencional, mas não foi relatado o uso de sêmen sexado congelado.

Vários outros estudos mostram diminuição da taxa de clivagem (CRAN *et al.*, 1995), de blastocisto (LU *et al.*, 1999), baixa taxa de prenhez (CRAN *et al.*, 1995) e capacitação parcial (LU e SEIDEL, 2004) quando se utiliza sêmen sexado congelado. Os dados deste experimento relataram que para a taxa de clivagem tanto o BB quanto o TRIS não apresentaram diferença do sêmen convencional não sexado.

Zhang, *et al.* 2003, não observaram diferenças significativas entre as taxas de produção de embriões utilizando sêmen sexado, sêmen submetido somente ao corante para sexagem ou sêmen convencional (20,3%, 21,6% e 22,3% respectivamente), concluindo que a separação dos espermatozóides ou o corante utilizado para a separação por citometria de fluxo não interferem no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Lu *et al.* (1999) encontraram diferenças significativas nas taxas de produção de blastocistos utilizando sêmen sexado ou convencional, mas afirmam que a utilização dessa biotécnica é viável para programas de PIV. Em um recente estudo, Wilson *et al.* (2005) obtiveram taxas de produção de blastocistos significativamente inferiores com a utilização de sêmen sexado em comparação ao sêmen convencional. Em contrapartida, Wheeler *et al.* (2006)

obtiveram resultados onde a produção de blastocisto não apresentou diferença estatística para o sêmen convencional, sêmen sexado e sêmen apenas corado.

No presente trabalho, o resultado mostrou que, para o desenvolvimento embrionário, não ocorreu diferença estatística entre o TRIS (19,9%) e o BB (26,0%), $p = 0,28$ e ainda como o BB apresentou maior produção, este não diferiu também do controle (33,5%), $p = 0,33$. Já a produção de embriões provenientes do TRIS mostrou-se estatisticamente inferior ao controle, $p = 0,03$. Estes resultados mostraram-se semelhantes à maioria dos trabalhos realizados recentemente, já que comercialmente utiliza-se o diluente TRIS para a criopreservação do sêmen sexado.

Um dos fatores limitantes para a PIV foi a padronização de um processo de preparação do sêmen adequado para o sêmen sexado. Os parâmetros espermáticos do sêmen sexado apresentam características próprias e assim sendo, os protocolos de seleção espermática utilizados para o sêmen convencional na PIV, não são os mais adequados quando se trata de sêmen sexado.

Além das doses comerciais de sêmen sexado apresentarem concentração espermática inferior à convencional, o padrão alterado de movimentação espermática resulta em dificuldade de sedimentação dos espermatozóides após a seleção em Percoll e, portanto, o número de células recuperadas é menor, resultando em uma concentração inadequada que, conseqüentemente, restringe a quantidade de ovócitos que poderiam ser fecundados. É possível que a baixa concentração espermática obtida após seleção em gradiente Percoll esteja relacionada com taxas mais baixas de clivagem e, conseqüentemente, com taxas inferiores de produção de blastocistos, na comparação com a produção com sêmen convencional ou não sexado (DELL'AQUA JR *et al.*, 2006).

Hoje, com um protocolo já desenvolvido, onde se preconiza a diminuição do volume de Percoll associado a alta força de rotação para a centrifugação (PONCHIROLLI *et al.*, 2006), já se consegue uma recuperação de células semelhante à recuperação das metodologias tradicionais para o sêmen convencional.

Assim, utilizando esta nova metodologia, pode-se ressaltar também a maior recuperação de células e a melhor motilidade pós-percoll do diluente BB

quando comparadas ao diluente TRIS. O BB apresentou maior MP, STR e LIN, e menor ALH e velocidade (VAP, VSL e VCL) em relação ao TRIS, o que ocasionou a recuperação de um maior número de células e uma melhor motilidade pós-percoll. Isto pode sugerir que o padrão de movimento de cada diluente pode interferir tanto quantitativamente quanto qualitativamente na recuperação do sêmen após a preparação para FIV.

Sabe-se que a resposta de cada touro ao processo de separação espermática por citometria de fluxo em relação a viabilidade espermática pós sexagem é um fator de grande variabilidade. Por isso novas pesquisas com uma maior quantidade de animais e várias repetições de rotina de FIV são necessárias para a confirmação dos resultados obtidos no presente experimento.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos concluiu-se:

1. Considerando-se um mesmo diluidor, não houve melhora nos parâmetros espermáticos avaliados dentre as diferentes metodologias utilizadas;
2. O diluente TRIS apresentou maiores índices de VAP, VCL, VSL e ALH sugerindo um padrão de hiperativação com maior gasto energético e conseqüentemente maior porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial em relação ao Botu-Bov®;
3. O diluente Botu-Bov® apresentou maiores índices de motilidade total e progressiva;
4. O diluente Botu-Bov® apresentou melhor proteção para as células espermáticas de acordo com as porcentagens de integridade de membrana plasmática e acrossomal;
5. A produção embrionária com o diluente Botu-Bov® foi semelhante à PIV com sêmen convencional (não sexado). Mas necessita-se de um maior número de repetições para confirmar este resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.
- ALM, K.; TAPONEN, J.; DAHLBOM, M.; TUUNAINEN, E.; KOSKINEN, E.; ANDRESSON, M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. **Theriogenology**, v.56, p.677-84, 2001.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v.7, p. 145, 1987.
- AMANN, R.P.; SEIDEL JR, G.E. Prospects for sexing mammalian sperm, Boudel, CO: p.288, 1982.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.
- ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, Y.; DEKEL, I.; GACITUA, H.; New trend in gamete's cryopreservation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 187, p. 77-81, 2002a.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; SHTURMAN, H.; GACITUA, H. Successful pregnancies in cows following double freezing of large volume of semen. **Reprod. Nutr. Sci. Dev.**, v. 42, p. 583-6, 2002b.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de

garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae** v.31(suplemento), p.226-7, 2003.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f . Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ASSUMPÇÃO, M.E.O.D., HAIPECK, K., LIMA, A.S., MELLO, M.R.B., OLIVEIRA, L.J., OLIVEIRA, V.P., TAVARE,S L.M.T., VISINTIN, J.A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.39, p.149-156, 2002.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factor detrimental to spermatozoa viability. **J. Anim. Sci.** v. 9, p. 143, 1950.

BUDWORTH, P.R.; AMANS, R.P.; CHAPMAN, P.L. Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 41-43, 1998.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

COSSON, J.A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell. Biol. Int.**, v.20, p. 83-94, 1996.

CRAN, D.G.; JOHNSON, L.A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Vet. Rec.**, v.136, p. 495-6, 1995.

- CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E.R; MARTINS JR, A.; NOVAES, J.L.C. Eficiência de dois diluidores para congelação de sêmen bovino processado em baixas concentrações. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 310, 2006.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome – reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-26, 1986.
- DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L. DACHEUX, F; Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 319-41, 2005.
- DAVIS, R.O., SIEMERS, I.L.I. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. **Reprod. Fétil. Dev.**, v. 7, p. 857-869, 1995.
- DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ARAÚJO JR, J.P.; FREITAS, C.P.; PONCHIROLLI, C.B.; FIGUEIREDO, A.S; et al Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p 205-212, 2006.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M.; Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1469, p.197-235, 2000.
- FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.; Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-18, 2005.
- GADELLA, B.M.; HARRISON, R.AP. The capacitating agente bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-20, 2000.

- GARNER, D.L., THOMAS, C.A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v.53(2) Jun, p.222-9, 1999.
- GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology** v. 65, p. 943-957, 2006.
- GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **J. Androl.**, v. 22, p. 519-26, 2001.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. fluorimetric evaluation of criopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v. 30, p. 369-78, 1988.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 34, p. 399-404, 1999.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1401-06, 1997.
- GRAHAM, E.F., SCHMEHL, M.K.L., NELSON, D.S. Problems with laboratory assays **Proc 8th tech ConfAI and reprod NAAB**, p. 1-8, 1980.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.
- HARRISON, R.A.; ASHWORTH, P.J.; MILLER, N.G.; Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 378-91, 1996.
- HARRISON, R.A.; GADELLA, B.M.; Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, p.342-51, 2005.

- HERNANDEZ-GONZALES, E.O.; SOSNIK, J.; EDWARDS, J.; ACEVEDO, J.J.; MENDOZA-LUJAMBIO, I.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; DEMARCO, I.; WERTHEIMER, E.; DARZON, A.; VISCONTI, P.E.; Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation associated hyperpolarization in mouse sperm. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5623-33, 2006.
- HO, H.C.; SUAREZ, S.S. An inositol 1,4,5-trisphosphato receptor-gated intracellular Ca^{++} store is involved in regulating, and acrosome reactions. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1606-15, 2001.
- HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, p. 1421-1433, 1999.
- HOLLINSHEAD, F.K.; GILLIAN, L.; O'BRIEN, J.K.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 15, p. 351-9, 2003.
- HOLT, C., HOLT, W.V., MOORE, H.D.M., REED, H.C.B., CURNOCK, R.M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **J. Androl.** v.18, p.312–23, 1997.
- HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J.; BABA, T.; Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Hum. Reprod. Update** v. 8, p. 405-12, 2002.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., SO"DERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v.53, p.859–75, 2000.
- JEULIN, C. LEWIN, L.M.; CHEVRIER, C.; SCHOEVAERT-BROSSAULT, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa in the assessment of human male fertility. **J. Androl.**, v.35, p.147-161, 1996

- JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for produciton of offspring: the state-of-the-art. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60/61, p.93-107, 2000.
- KLINC, P.; SIEG, B.; RATH, D. Flow cytometrical sorting for gender affects velocity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 39, p. 264, 2004.
- LASLEY J.F.; EASLY, G.T.; BOGART, R. Some factors influencing the resistabce of bull sperm to unfavorable environmental conditions. **J. Anim. Sci.**, v. 1, p. 79, 1942.
- LU, K.H.; CRAN, D.G., SEIDEL JR, G.E. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393-405, 1999
- LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-30, 2004.
- MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W.N.; BOROS, L.G.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; *et al.* Metaolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS lett**, v. 554, p. 342-6, 2003.
- MARTINS JR, A.; CALEGARI, R.S.; CRESPILOHO, A.M.; PAPA, F.O. Viabilidade *in vitro* de sêmen de touro criopreservado com dois diluentes e reduzida concentração espermática. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p. 311, 2006.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline nalysisi of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, p. 408-18, 1997.
- MAXWELL, W.M.C.; 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. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 10, p. 433-40, 1998.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 125, 1984.
- MCLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.; HULL, M.G.; Motility characteristics and membranes integrity of cryopreserved human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 95, p. 527-34, 1992.
- MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J.; Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 125, p. 625-33, 2003.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.M.; 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.929-36, 2006.
- MORAN, D.M. et al. Determination of temperature and cool rate induced cold shock stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p. 999, 1992.
- MUKAI, C.; OKUNO, M.; Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biol. Reprod.**, v. 71, p. 540-7, 2004.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A triple- stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol. Reprod.**, v. 68, p.1828-35, 2003
- PHILLIPS, P.H.; The preservation of bull semen. **J. Bio. Chem.**, v. 130, p. 415, 1939.
- PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Fort Collins, CO: *Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory*,. Bulletin, n.3. 1987.

- PINTADO, B.; DE LA FURNTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nuclei acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **J. Reprod Fertil**, v.118, p.145-152, 2000.
- PONCHIROLLI, C.B.; FONSECA, E.J.; TEOBALDO FILHO, O.; MORENO, J.F. Protocolo de utilização de sêmen sexado na fertilização de oócito bovino. **Acta Scientiae Veterinariae** v.34, p. 483, 2006.
- RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R.D.; Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1043-51, 2002.
- RATH, D.; RUIZ, S.; SIEG, B. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. **Vet. Rec.**, v. 152, p. 400-1, 2003a.
- RATH, D.; SIEG, B.; LEIGH, J.; KLINE, P.; BESSELING, M.; KRUGER, C. *et al.* Current perspectives of sperm sorting in domestic farm animals. In: **Proceedings of 19th Meeting Association of Europeenne de Transfert Embryonnaire** p. 125-8, 2003b.
- RATH, D.; TOPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H.W.; SCHWARTZ, P.; EBELING, S.; Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 352-62, 2005.
- REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochem.**, v.30, p.4480-6, 1991.
- RENS, W.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Improved flow cytometric sorting of X and Y- bearing sperm: substantial increase in yield of sexed semen. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 52, p.50-6, 1999.

- REVELL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.36, p.77–86, 1994.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VAZQUEZ, J.M.; *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p.514-35, 2005.
- RORIE, R.W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenology**, v. 52, p. 1273-80, 1999.
- RUUVUNA, F.; TAYLOR, J. F.; WALTER, J. P.; TURNER, J. W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 1091-97, 1992.
- SAMPER, J.C., HELLANDER, J.C., CRABO, B.G. Relation between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters. **J. Reprod. Fertil.**, v. 44 (suppl.), p. 107, 1991.
- SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIZER, L.N.; SCHENK, J.L.; *et al.* Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Anim. Reprod.**, v. 1, p. 86-90, 2004.
- SCHAFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.173-82, 2006.
- SCHENCK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p. 1375-91, 1999.
- SCHURMANN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A.; DOEGE, H.; JOOST, H.G.; The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrossomal region of mature spermatozoa. **Cell. Tissue. Res.**, v. 307, p. 237-42, 2002.

- SEIDEL JR, G.E, GARNER, D.L. Sexing mammalian sperm by flow cytometry/cell sorting. **Reproduction** 124, 2002.
- SEIDEL JR, G.E. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-98, 2003.
- SEIDEL JR, G.E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology and biology. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 79, p. 145-56, 2003.
- SEIDEL JR, G.E.; BRINK, Z.; SCHENK, J.L. Use of heterospermic insemination with fetal sex as the genetic marker to study fertility of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 59, 2003.
- SEIDEL JR, G.E.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 711-4, 2002.
- SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L. Field trials with sexed bovine semen In: **Proceedings of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction** p. 64-9, 2002.
- SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z.; GREEN, R.D.; *et al.* Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-20, 1999.
- SEIDEL JR., G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1267-72, 1999.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-78, 2006.
- SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. Pregnancy rates with cryopreserved semen. In: **Proceedings of the Techniques for Handling and Utilization of Transported Cooled and Frozen Equine Spermatozoa**, Fort Collins, CO, p. 106, 1995.
- SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals; mechanisms of formation. **Biol. Reprod.**, v.58, p.1105-1107, 1998.

- SUH, T.K.; SCHENK, J.L. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. **Theriogenology**, v. 59, p. 516, 2003.
- SUH, T.K.; SCHENK, J.L.; SEIDEL JR, G.E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035-48, 2005.
- SZASZ, F.; SIRIVADYAPONG, S.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; COLENBRANDER, B.; *et al.* Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, p.289-98, 2000.
- TUBMAN, L.M.; BRINK, Z.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Normality of calves resulting from sexed sperm. **Theriogenology**, v. 59, 2003.
- VALCARCEL, A., HERAS, M.A., MOSES, D.F. *et al.* Comparison between Sephadex G-10 and percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.41, p.215-224, 1996
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-79, 2002
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertility capacity. **Reprod. Dom. Anim.**, v.31, p. 135-140, 1999.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clarke, A. (eds): Effects of low temperatures on biological membranes. **London, academic Press**, p.189, 1981.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In fin G.C., editor. Oxford reviews of reproductive biology. **London: Oxford University Press**; p.283-350, 1979.

- WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VAN ETEN, T.; MAWSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.219-27, 2006.
- WILSON, R.D.; FRIECKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L; RUTLEDGE, J.J.;PENFIELD, C.M.; WEIDEL, K.A.. *In vitro* Production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, 2005.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. **Zygote**, v. 2, p.371-2, 1994.
- ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H..Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology** v.48, p.221-31, 1997.
- ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL JR, 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. 1657-63, 2003.
- ZÚCCARI, C.E.S.N., MADUREIRA, J.S., CONTI, N. *et al.* Integridade da membrana plasmática de espermatozóide eqüino submetido ao teste de longevidade à temperatura ambiente. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, Gramado. *Anais...* Gramado: SOVERGS, v. 25, p.241, 1997.

ANEXO I

SETUP – HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 15

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	30
Taxa de aquisição das imagens.....	60 Hz
Contraste mínimo da célula.....	50
Tamanho mínimo da célula.....	6 pixels
Contraste para células imóveis.....	30
Retilinearidade (STR), Limiar.....	60%
Valor de corte de VAP para células lentas.....	30,0 µm/s
VAP mínimo para células progressivas.....	40,0 µm/s
Valor de corte de VSL para células lentas.....	20,0 µm/s
Tamanho da célula.....	6 pixels
Intensidade da célula.....	80
Intensidade da cabeça estática.....	0,23 a 1,91
Tamanho da cabeça estática.....	0,56 a 1,20
Alongamento estático.....	8 a 92
Aumento.....	1,89
Frequência de vídeo.....	60
Intensidade de iluminação.....	2203
Temperatura	37°C

ANEXO II**TRIS – gema de ovo (Sexing Technologies do Brasil)**

MEIO 1 (fração sem glicerol)		
QUIMICOS		
TRIS		200 mM
Acido Cítrico		65 mM
Frutose		56 mM
gema de ovo		20 %
Antibióticos	Tilosina	11,7 mg/mL
	Gentamicina	100 mg/ mL
	Lincoespectina	50 -100 mg/ mL
pH		6,8

MEIO 2 (fração com glicerol)		
QUIMICOS		
TRIS		200 mM
Acido Cítrico		65 mM
Frutose		56 mM
gema de ovo		20 %
Antibiótcos	Tilosina	11,7 mg/mL
	Gentamicina	100 mg/ mL
	Lincoespectina	50 -100 mg/ mL
pH		6,8
glicerol		12%