

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

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES “X” VIÁVEIS, DE
SÊMEN CONGELADO, POR GRADIENTE DESCONTÍNUO DE
DENSIDADE, NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
DESTINADOS A CRIOPRESERVAÇÃO**

Ana Paula Perini

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

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

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES “X” VIÁVEIS, DE
SÊMEN CONGELADO, POR GRADIENTE DESCONTÍNUO DE
DENSIDADE, NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
DESTINADOS A CRIOPRESERVAÇÃO**

ANA PAULA PERINI

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

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA PAULA PERINI – nascida em 21 de Fevereiro de 1980 na cidade de Araxá – MG. Em março de 1999 ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia – MG. Apresentou trabalho de graduação intitulado “Avaliação Microbiológica do Gás Ozônio e da Estufa a Seco na Esterilização de Fios Cirúrgicos”. Graduiu – se em 09 de Janeiro de 2004. Em Julho de 2004 especializou-se na área de “Biotecnologia da Reprodução Animal” pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em Março de 2005 iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal.

“Depois de algum tempo a gente aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. Começa a aprender a construir todas as nossas estradas no hoje, pois o terreno do amanhã é incerto demais para planos e o futuro tem costume de cair em meio ao vão.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias e que não importa o que se tem na vida, mas QUEM se tem na vida, e que os bons amigos são a família que nos foi permitido escolher.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas que somos responsáveis por nós mesmos. Aprende que não importa onde já chegamos, mas onde estamos indo. Mas se não soubermos nosso destino, qualquer lugar serve.

Aprende que maturidade tem mais a ver com as experiências que tivemos e o que aprendemos com elas do que com quantos aniversários celebramos e que há mais de nossos pais em nós do que possamos imaginar.

Aprende que quando se está com raiva, tem-se o direito de estar com raiva, mas isto não nos dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não nos ama da forma que a gente quer que ame não significa que não nos ama com todo seu ser.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes é preciso perdoar a nós mesmos. Aprende que com a severidade com que julgamos seremos um dia condenados.

E a gente aprende a realmente suportar... que somos realmente fortes e podemos ir muito mais longe... depois de pensar que não podemos mais. E que realmente a vida tem valor e temos valor diante da vida.”

William Sheakespeare

DEDICO

A minha mãe, meu pai e minha irmã. Por todo amor, apoio, carinho e compreensão.

Meus espelhos, meu alicerce, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível!

Aos meus pais Mirtes e Ademar e minha irmã Ana Claudia pelo apoio durante toda a minha vida!

A Professora Vera pela orientação, pelos ensinamentos e por estar sempre pronta a me ajudar em tudo que precisei! Mais que minha orientadora, se tornou uma amiga por quem tenho muito respeito e admiração!

Ao Professor Wilter que aceitou gentilmente meu convite para participar da banca!

Ao Professor Elmo, meu professor na graduação em Uberlândia e hoje membro da minha banca de mestrado. É muito importante para mim, pois foi nas suas aulas que me decidi pela Reprodução Animal como área a seguir dentro da veterinária.

Aos amigos do departamento: Clara, Cris, Danilas, Felipe, Jú, Junior, Kellen, Letícia, Mabel, Maria Emília, Marcelo, Michelly, Naiara, Roberta, Simone e Tati! Pelos anos de convivência, pelas brincadeiras, pelas horas intermináveis de conversas, pelos churrascos e festas juntos!

A minha equipe de experimento Aline, Max e Jacqueline por toda ajuda, amizade, paciência, apoio...tenho muito a agradecer a vocês!

Um agradecimento muito especial a Aline...mais que minha parceira de equipe, se tornou uma grande amiga! Me ajudou muito em todos os momentos que precisei, não só no meu trabalho, mas na vida pessoal também! Uma amizade verdadeira que tenho certeza, vai ser para a vida toda!

Aos funcionários do departamento Ivo, Bel, Roberta e Paulo. Principalmente a Rô, que me ensinou muito do que sei até hoje.

A todos os docentes do Departamento, cada um me ensinou um pouquinho do que está aqui!

Ao Cenatte Embriões em Pedro Leopoldo e ao Wilson por ter cedido gentilmente o laboratório para a realização de uma parte do meu experimento.

A tia Rosa, tio Zé Antônio, Léo, Lílian e Laurinha por terem me hospedado em BH durante um mês! Foi muito importante para mim esse tempo junto com vocês!

Aos grandes amigos de todos os momentos, Andreza, Gerus e Fer sempre juntos nas más e nas melhores horas de minha vida! Gerus brigadão por tudo!

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Resumo.....	vii
Summary.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	01
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1.Fatores que afetam a viabilidade pós descongelação dos ePIV bovinos.....	03
2.2.Perspectiva para a seleção do sexo na ePIV.....	05
2.3.Seleção do sexo de espermatozóides.....	06
2.3.1.Diferenças no conteúdo de DNA.....	06
2.3.2.Diferenças de densidade.....	10
3.HIPÓTESES.....	12
4.OBJETIVOS.....	13
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1.Obtenção e seleção dos oócitos.....	15
5.2.Tratamento controle e controle destinado a criopreservação.....	15
5.2.1.Maturação <i>in vitro</i>	15
5.2.2.Fecundação <i>in vitro</i>	16
5.2.3.Cultivo <i>in vitro</i>	17

5.3.Tratamento sexado e sexado destinado a criopreservação.....	
5.3.1.Fecundação <i>in vitro</i>	17
5.3.1.1.Preparação do gradiente descontínuo de densidade.....	18
5.3.1.2.Centrifugação e recuperação dos espermatozóides no gradiente de sexagem.....	20
5.4.Congelação dos embriões dos tratamentos controle e sexado destinados a criopreservação.....	22
5.5.Descongelação dos embriões dos tratamentos controle e sexado destinados a criopreservação.....	25
5.6.Análise dos resultados.....	25
5.6.1.Verificação do desvio da proporção sexual pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos embriões bovinos.....	25
5.6.2.Desvio da proporção sexual dos embriões.....	27
5.6.3.Criotolerância dos embriões.....	27
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1.Avaliação do sêmen.....	28
6.2.Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	29
7.CONCLUSÕES.....	34
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- **μL** - microlitro
- **BSA** – Albumina Sérica Bovina
- **Bi** – blastocisto inicial
- **BI** – blastocisto
- **Bx** – blastocisto expandido
- **COC** – complexo *cumulus* - oócito
- **DMEM** – “Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium”
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- **ePIV** – Produção *in vitro* de embriões
- **FIV** – fertilização *in vitro*
- **G14** – Gradiente 14
- **G6PD** – glucose 6 fosfato desidrogenase
- **GSH** - glutationa
- **HEPES** – N(2-Hydroxethyl)piperazine –N` (ethanesulfonic acid)
- **IA** – Inseminação Artificial
- **INF-τ** – interferon tau
- **mL** - mililitro
- **mRNA** – ácido ribonucléico mensageiro
- **PCR** – reação em cadeia da polimerase
- **PIV** – produção *in vitro*
- **ROS** – espécies reativas do oxigênio
- **SFB** – soro fetal bovino
- **SOF** – synthetic oviduct fluid
- **TALP** – Tyrode`s Albumin – Lactate – Pyruvate
- **TE** – transferência de embriões
- **XIAP** – proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela01- Avaliação do sêmen de touro da raça Nelore quanto a motilidade e vigor pós descongelação; concentração, motilidade, vigor e porcentagem de espermatozóides após a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll.....	28
Tabela02- Taxas de clivagem e produção total de embriões.....	29
Tabela03- Porcentagem de embriões do sexo masculino e feminino (identificados pela PCR) dos tratamentos sexado e controle que não foram congelados por não atingirem o estágio de BI ou Bx.....	30
Tabela04- Porcentagem de machos e fêmeas dos tratamentos sexado e controle após a PCR do número total de embriões (BI e Bx) eclodidos ou não após a congelação e descongelação.....	30
Tabela05- Porcentagem de machos e fêmeas dos tratamentos sexado e controle após a PCR dos embriões eclodidos pós congelação, descongelação e cultivo.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura01- Foto digitalizada de oócitos de bovinos após aspiração e 24 h de maturação <i>in vitro</i>	16
Figura02- Foto digitalizada da preparação do gradiente descontínuo de sexagem de Percoll™.....	19
Figura03- Foto digitalizada da preparação do gradiente descontínuo de sexagem de Percoll™.....	19
Figura04- Foto digitalizada do sêmen descongelado depositado sobre o gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.....	20
Figura05- Foto digitalizada do sedimento de sêmen formado após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.....	21
Figura06- Foto digitalizada dos embriões no sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i> após a fecundação.....	22
Figura07- Foto digitalizada das palhetas identificadas contendo os embriões produzidos <i>in vitro</i> e acondicionadas no equipamento utilizado para a congelação.....	24
Figura08- Foto digitalizada do equipamento utilizado para a congelação dos embriões produzidos <i>in vitro</i>	24

Figura09- Foto digitalizada do gel de agarose contendo os produtos da PCR em que está identificado embrião como macho quando foram visualizadas as bandas de 280, 210 e 196 pb e como fêmea quando somente a banda de 280 pb foi visualizada..... 27

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES “X” VIÁVEIS, DE SÊMEN
CONGELADO, POR GRADIENTE DESCONTÍNUO DE DENSIDADE, NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DESTINADOS A CRIOPRESERVAÇÃO**

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivos separar os espermatozóides portadores do cromossomo X viáveis, dos portadores do Y, através de gradiente descontínuo de densidade de PercollTM. Utilizar esse sêmen na produção *in vitro* de embriões bovinos, substituindo o SFB pela BSA no cultivo. Congelar estes embriões pelo método da congelação lenta. Avaliar a criotolerância dos embriões do sexo feminino pela taxa de eclosão e a eficiência do gradiente pela técnica da PCR, que identificou o sexo dos embriões produzidos. Foram produzidos 133 embriões do tratamento sexado (embriões produzidos a partir de sêmen submetido ao gradiente de densidade de PercollTM) e 100 do tratamento controle (embriões produzidos de acordo com o protocolo utilizado no departamento de Reprodução Animal). Após congelação, descongelação e cultivo destes embriões apenas 8 eclodiram do tratamento sexado e também 8 do tratamento controle, a análise estatística deste resultado demonstrou que o sexo não influenciou na taxa de eclosão pós descongelação. Porém a análise estatística dos embriões produzidos com sêmen sexado e submetidos a PCR demonstrou que o gradiente de densidade de PercollTM foi eficaz na separação dos espermatozóides X viáveis em 62%.

Palavras-Chave: Congelação lenta, embriões bovinos, gradiente de densidade de PercollTM, PCR, proporção sexual, taxa de eclosão.

**VIABLE “X” SPERM SEPARATION, FROM FROZEN SEMEN, BY
DESCONTINUOUS DENSITY GRADIENT, ON *IN VITRO* PRODUCTION EMBRYOS
PROCEDURE TO CRYOPRESERVATION**

SUMMARY – The present study had as purposes to separate X and Y sperm by Percoll™ descontinuous density gradient. Use the semen on *in vitro* production bovine embryos, replacing the BFS for BSA on the culture. To freezing the embryos by the slow curve method. Evaluate the female embryos cryotolerance by eclosion rate and the gradient eficience by PCR technique that identify the embryos sex. 133 embryos were produced by the sexed treatment and 100 by control treatment. After freezing, unfreezing and culture of the embryos, only 8 ecloded of each treatment, the result statistics analyses showed that the sex had no influence on the eclosion rate after unfreeze. However the statistics analyses of the sexed semen produced embryos and submitted to PCR showed that the Percoll™ density gradient was efficient on the viable X separation sperm in 62%.

KEYWORDS: Slow freezing, bovine embryos, Percoll™ density gradient, PCR, eclosion rate.

1. INTRODUÇÃO

A técnica de produção *in vitro* de embriões (ePIV) bovinos é uma metodologia de rotina para pesquisas em transgênese, clonagem, sexagem bem como é um procedimento comercial que auxilia nos programas de teste de progênie e melhoramento genético. Entretanto, para se conseguir uma maior flexibilidade e eficiência do uso dessa biotecnologia, é essencial que os embriões produzidos possam ser estocados em nitrogênio. A criopreservação é o instrumento que irá permitir a ampla utilização comercial da biotécnica de ePIV na pecuária (KHURANA & NIEMANN, 2000; WOODS *et al.*, 2004).

A criopreservação tem como princípio manter a vitalidade embrionária durante longo período em estado de letargia reversível após a descongelação. Essa característica permite as seguintes aplicações: a) manter e preservar a viabilidade dos embriões excedentes de um programa de ePIV; b) otimizar a logística no transporte, a exportação e a importação de espécies e raças de interesse zotécnico ou zoológico; c) utilizar o estro natural das receptoras ou formar banco de embriões visando preservar material genético de espécies em perigo de extinção; d) possibilitar uma avaliação futura do melhoramento animal por permitir que um grande número de características genéticas seja confrontado ao longo do tempo.

Desde a introdução, em 1949, do glicerol como um agente crioprotetor permeável, um dos métodos mais estudados para a criopreservação de embriões, inclusive aqueles produzidos *in vitro*, é a congelação controlada. Nesse processo os embriões são desidratados pelo cultivo com o crioprotetor e submetidos a uma curva de congelação lenta ou rápida (WOODS *et al.*, 2004).

A congelação de ePIV demonstra resultados contraditórios que em média são de 18% de prenhez e não conclusivos, no que diz respeito às causas da baixa viabilidade após a descongelação desses embriões (TOMITA , 2003).

Entre as explicações para a baixa criotolerância dos ePIV estão a qualidade morfológica insatisfatória (TOMITA, 2003), a inadequada composição dos meios de cultivo *in vitro* e deficiências na expressão gênica (RIZOS *et al.*, 2003), bem como o sexo do embrião (KIMURA *et al.*, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fatores que afetam a viabilidade pós descongelação dos ePIV bovinos

A baixa criotolerância dos ePIV, torna necessário o desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* e congelação que permitam aumentar a resistência dos mesmos ao processo de congelação (RIZOS *et al.*, 2003; TOMITA, 2003).

O meio de cultivo, congelação e o crioprotetor a ser usado, são extremamente importantes para a sobrevivência dos embriões. A eliminação do SFB no meio de cultivo aumenta a crio-resistência dos blastocistos (SANG-RAE *et al.*, 2002). Os mesmos autores não observaram diferença na maturação nuclear e clivagem de embriões cultivados em meio suplementado com ou sem SFB porém, a sobrevivência dos embriões, após descongelação, foi significativamente maior no grupo que não foi suplementado com SFB. Com 36 horas de cultivo pós descongelação os blastocistos que se desenvolveram neste mesmo meio tinham um número significativamente maior de células comparado com os que foram cultivados com SFB.

Pugh *et al.* (1998), demonstraram que a composição de proteínas no meio de congelação pode afetar significativamente a sobrevivência dos embriões após a descongelação e que a sobrevivência de mórulas compactas pode ser aumentada com a suplementação de BSA adicional. Demonstraram também que a presença de lecitina no meio de cultivo não afetou o desenvolvimento dos embriões, mas reduziu significativamente a sobrevivência após a descongelação, sugerindo que, talvez, a lecitina tenha alterado a composição da membrana dos embriões.

A qualidade dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* é sempre inferior a daqueles produzidos *in vivo* (TOMITA, 2003). Existe uma grande diferença, bioquímica e morfológica, entre esses dois grupos de embriões que influencia na sua sobrevivência após a criopreservação. Essas diferenças incluem alteração na compactação das células, na expressão de genes e o grande aumento na quantidade de lipídeos nos embriões produzidos *in vitro* (PUGH *et al.*, 2000).

A qualidade dos oócitos e as condições de cultivo determinam a taxa de produção e qualidade dos blastocistos após a fecundação e, conseqüentemente, a resistência a congelação (TOMITA, 2003; GASPARRINI *et al.*, 2003). A suplementação do meio de maturação com cisteína e cisteamina (GASPARRINI *et al.*, 2003) ou precursores de glutatona (AVELINO, 2004) aumentam a síntese de GSH que, por sua vez, protege as células do estresse oxidativo, prejudicial ao desenvolvimento *in vitro* de embriões.

Khurana e Niemann (2000), demonstraram que embriões produzidos *in vitro* ou pré expostos as condições de cultivo *in vitro* são mais sensíveis as injúrias causadas pela criopreservação. Essa sensibilidade é afetada pela qualidade dos embriões que é demonstrada bioquimicamente no meio de cultivo pela determinação do metabolismo oxidativo dos mesmos.

O metabolismo aeróbico leva a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) como superóxido e peróxido de hidrogênio. As técnicas de produção *in vitro* expõem os embriões, os quais não se beneficiam da proteção antioxidante maternal: a atmosfera de 20% de oxigênio ao invés de aproximadamente 7% (como no oviduto), a luz e traços de metal pesado no meio de cultura. Todos esses fatores são responsáveis por um aumento na produção de ROS, os quais podem ter efeitos deletérios nos embriões (LEYENS *et al.*, 2004).

Da mesma forma, a existência de diferenças na quantidade de transcritos de alguns genes importantes no processo de desenvolvimento (dependente das condições de cultivo) pode explicar a diferente qualidade morfológica e criotolerância entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (RIZOZ *et al.*, 2003). Assim, a qualidade morfológica dos oócitos e o número de embriões cultivados em um determinado volume de meio de cultura, alteram a expressão de genes importantes para o estabelecimento da prenhez como o INF- τ (LARSON & KUBISCH, 1999).

O INF- τ é um fator anti-luteolítico secretado por embriões de bovinos e ovinos e está envolvido com o reconhecimento da prenhez. É um produto de genes autossômicos e é secretado por blastocistos expandidos do sexo feminino em uma concentração duas vezes maior que embriões do sexo masculino no mesmo estágio de

desenvolvimento. As possíveis explicações para essa diferença são que os embriões do sexo masculino são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, e que os do sexo feminino produzem mais INF- τ porque a atividade da via pentose fosfato (PPP) é elevada devido à inativação tardia do cromossomo X (KIMURA *et al.*, 2004).

A concentração de glicose no meio de cultura pode afetar a morte celular por apoptose e a proporção sexual nos blastocistos produzidos *in vitro*. A apoptose de embriões bovinos começa no estágio de mórula e continua durante o seu desenvolvimento. A apoptose mantém a qualidade embrionária removendo as células danificadas. Ela é regulada pela atividade de genes pró e anti-apoptose durante o desenvolvimento pré-implantação (RIZOS *et al.*, 2003).

Os inibidores da proteína apoptótica são um grupo de proteínas intracelulares cuja função é manter a célula viva. A proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP) é uma das cinco proteínas identificadas nos mamíferos. A XIAP é importante no controle da apoptose pela modulação da ativação e atividade da caspase nas células do trofoblasto (JIMÉNEZ *et al.*, 2003). De acordo com os autores aqui citados a criotolerância está relacionada ao sexo feminino assim, pode-se esperar que o desvio da proporção sexual, em favor das fêmeas, pela utilização de espermatozoides X para a ePIV aumente as taxas de eclosão *in vitro* após a descongelação desses embriões.

2.2. Perspectivas para a seleção do sexo na ePIV

A partir da década de 80, o aprimoramento e a difusão das técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões, dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda de sistemas de produção mais eficientes, intensificaram o estudo e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo de espermatozoides e embriões pré-implantados, em espécies de interesse zootécnico. A seleção do sexo tem um valor econômico significativo nesses animais com aptidão para produção de leite e carne, em sistemas em que a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR, 1985; VAN VLECK *et al.*, 1987; RUVUNA *et al.*, 1992; HOHENBOKEN, 1999).

A aplicação destas biotecnologias, principalmente a sexagem de espermatozóides associada a ePIV, possui um mercado potencial atrativo nas espécies de interesse zootécnico, principalmente nos bovinos, já que o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo (196 milhões de cabeças). A ePIV desponta como uma nova biotecnologia, com mercado em crescimento. Em 2005 foram feitas cerca de 150 mil transferências de embriões produzidos *in vitro*, deixando o país em primeiro lugar no mundo (Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões).

Entretanto, a utilização comercial, ou no teste de progênie, de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado será mais viável economicamente se for possível congelar estes embriões, pela utilização de um método que permita a transferência direta dos mesmos. Estes procedimentos diminuiriam os custos com a sincronização do ciclo estral de receptoras e facilitaria a comercialização no Brasil e exterior, bem como para propriedades desprovidas de estrutura laboratorial, onde estejam as fêmeas receptoras disponíveis (NIEMMAN, 1991; TOMITA, 2003; RIZOS *et al.*, 2003).

O aprimoramento de técnicas para seleção do sexo associadas à ePIV, demanda uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido é oportuno rever os resultados das rotas tecnológicas para a seleção do sexo de espermatozóides.

2.3. Seleção do sexo de espermatozóides

2.3.1. Diferenças no conteúdo de DNA

A identificação microscópica dos cromossomos sexuais acessórios (X e Y) em 1910 foi um marco no campo das pesquisas objetivando a sexagem de espermatozóides, pois geraram uma idéia de que o sexo poderia ser controlado por estas estruturas especializadas (SEIDEL *et al.*, 1999). A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies, sendo que o X possui uma quantidade maior. E até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON & WELCH, 1999). Essa diferença é de cerca de 4,0% e foi constatada em várias espécies de mamíferos (GARDNER *et al.*, 1983; JOHNSON *et al.*, 1994).

Com base nesta diferença, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozoides: a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade.

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento (U\$ 250,000) e pela baixa produção/equipamento/hora, que não ultrapassa 12 milhões de espermatozoides em alta velocidade de separação (JOHNSON e WELCH, 1999) restringindo bastante sua utilização na indústria da inseminação artificial. Outros fatores limitantes são:

a) O baixo número de espermatozoides sexados viáveis; b) A longa exposição ao corante sob alta temperatura (37°C); c) Diminuições drásticas nos parâmetros de fertilidade avaliados *in vitro* (produção *in vitro* de embriões); d) Impossibilidade de sexar sêmen congelado devido ao fato de que o processo de congelação prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos com o corante Hoechst 33342 (JOHNSON,1994). Isso limita a utilização dessa técnica em doses de sêmen de touros de várias centrais ou criadores na produção *in vitro* de embriões. O que restringe a utilização dos melhores touros (touros provados), dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a produção *in vitro* de embriões; e) Impossibilidade de sexar sêmen *in natura* de alguns touros; f) Rápida desaceleração na saída do citômetro, de 90 para 0km/h, quando os espermatozoides são colhidos nos tubos coletores durante o processo de sexagem.

Em bovinos a literatura denota que os resultados de fertilidade a campo, utilizando os espermatozoides sexados por este método, demonstram índices favoráveis em condições experimentais e estritamente controladas, o que inclui a execução e supervisão da inseminação artificial por profissionais (técnicos e médicos veterinários).

Um exemplo deste fato foi um estudo recente realizado na Suíça, no qual espermatozoides descongelados e sexados por citometria de fluxo e espermatozoides não sexados (2 milhões/dose) foram depositados no corpo do útero de novilhas e vacas. A taxa de prenhez pela IA com espermatozoides sexados foi de 29,6% e 23,8%,

para novilhas e vacas, respectivamente. Utilizando espermatozóides não sexados a taxa de prenhez foi de 59,3% para novilhas e 26,6% para vacas, após 70 a 90 dias da inseminação artificial (BODMER *et al.*, 2005). Nesse mesmo estudo foi constatada uma maior taxa de perda embrionária quando se utilizou espermatozóides sexados por citometria, alcançando 11,1% em novilhas e 15,8% em vacas. Em contraste, utilizando-se espermatozóides não sexados, a taxa foi de apenas 2,9% em vacas e 0% em novilhas.

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

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

Devido a esse fato, nos rebanhos de elite, as últimas estimativas de um progresso genético mais modesto do que aquele predito anteriormente (15%), VAN VLECK *et al.*, (1987) citado por WEIGEL, (2004) sugeriram que a habilidade de alterar a proporção sexual da progênie de touros e vacas de elite tem menor impacto no ganho genético anual, que é aumentado em torno de 0,4 a 1,4%, mesmo quando associado às múltiplas ovulações e transferência de embriões. Além disso, os programas de melhoramento também ficam prejudicados já que apenas 150-200 doses de sêmen enriquecidas com espermatozóides X podem ser produzidas, por dia, por citometria de fluxo. Esse número corresponde a menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado, por exemplo nos Estados Unidos. Esses fatores são limitantes

para a utilização do sêmen sexado (WEIGEL, 2004).

Na ePIV, apesar dos tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta) aparentemente não impedirem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, Libbus *et al.* (1987) observaram aberrações cromossômicas em 50% dos espermatozóides de *Microtus oregoni*, após a sexagem por esse método.

Morton *et al.* (2007), verificaram que os embriões produzidos *in vitro*, nos quais se utilizou espermatozóides sexados por citometria, possuíam uma expressão alterada no RNA mensageiro de alguns genes importantes em seu desenvolvimento, comparados com aqueles em que não se utilizou espermatozóides sexados. Dentre esses o Glut-3, que é responsável pelo transporte da glicose do exterior para o interior do embrião, em que a sua diminuição provoca um desenvolvimento reduzido. A Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), responsável pela desintoxicação celular frente aos radicais livres, também possui uma diminuição na sua expressão, provocando atraso no desenvolvimento. Outras alterações podem ser encontradas na expressão dos genes XIST, envolvido na inativação do X, e HSP-70.1 que é um indicador de estresse embrionário.

Assim, é difícil concluir como seriam os resultados em países como o Brasil, que possui uma pecuária caracterizada por heterogeneidade de condições de manejo. Neste sentido considera-se que para a realidade brasileira é mais interessante optar por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem em torno de 75%, mas que permita, em condições variadas de manejo, obter taxas de fertilidade satisfatórias.

2.3.2. Diferenças de densidade

Esses métodos envolvem processos de centrifugação e se baseiam na diferença de densidade entre essas duas populações de espermatozóides. A análise da cabeça dos espermatozóides por microinterferometria demonstrou que os espermatozóides X contém mais DNA e proteína nuclear que os espermatozóides Y e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. Estimou-se que a diferença de DNA do espermatozóide X em relação ao Y, de bovinos, resultava em uma diferença de densidade de pelo menos 7×10^{-3} g/cm³ ou 0,06% a mais (WINDSOR *et al.*, 1993; CHANDLER *et al.*, 1999). Na tentativa de separação dos espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade utilizou-se Ficoll, Ficoll-Metrizoato de Sódio e PercollTM (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998).

Em bovinos desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de PercollTM com acuidade de cerca de 70%. Quando utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 2000, 2003). O aprimoramento deste método de centrifugação em gradiente descontínuo de PercollTM, em substituição aos métodos convencionais de preparação dos espermatozóides antes da fecundação, poderá ser uma alternativa para associar a sexagem de espermatozóides à ePIV comercial.

O PercollTM é um meio bem referenciado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares. A solução estéril é composta por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona (PVP). Com o PercollTM é possível a formação de gradientes com densidade de até 1,130g/mL, com osmolaridade menor que 300 mOSm/Kg H₂O. Para isso, é necessário preparar-se uma solução estoque contendo nove partes de PercollTM e uma parte de solução com 1,5M de NaCl ou 2,5M de sacarose (VICENT & NADEAU, 1984).

Existem dois tipos de gradientes de densidade; a) contínuos: há um aumento gradual da densidade da parte de cima do gradiente até a parte de baixo, não sendo possível observar as camadas formadas; b) descontínuos: é possível a visualização das

camadas dos gradientes em que, a camada mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo-se nas partes superiores. Para a formação do gradiente contínuo, há necessidade de se montar um gradiente descontínuo de 3 a 4 camadas, inicialmente, na qual a transformação ocorre pela difusão destas camadas, colocando-se o tubo na horizontal e reorientando-o novamente.

3. HIPÓTESES

1) A substituição do procedimento destinado à separação de espermatozóides viáveis, na produção *in vitro* de embriões, por um gradiente de densidade de Percoll™ (gradiente de sexagem) sedimenta, preferencialmente, os espermatozóides X viáveis.

2) As seguintes modificações no meio de cultivo, utilizado para o desenvolvimento dos embriões, maximizam o desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino: a) substituição do SFB pela BSA; b) eliminação da glicose no meio de desenvolvimento embrionário.

3) As modificações da hipótese 2 aumentam a criotolerância dos ePIV quando associadas a modificações que reduzam o estresse oxidativo na punção, maturação, fecundação dos oócitos e desenvolvimento dos embriões.

4) Os ePIV do sexo feminino produzem maior taxa de eclosão pós descongelamento devido a sua maior criotolerância.

4. OBJETIVOS

1) Substituir o procedimento destinado à separação dos espermatozóides viáveis para a produção *in vitro* de embriões, por um gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ (gradiente de sexagem) que sedimente, preferencialmente, os espermatozóides X viáveis.

2) Avaliar a qualidade dos espermatozóides sexados pela taxa de clivagem e desenvolvimento *in vitro* de embriões.

3) Substituir o soro fetal bovino (SFB) pela albumina sérica bovina (BSA) para maximizar o desvio da proporção sexual e aumentar a criotolerância dos embriões.

4) Comparar o protocolo de ePIV associado à sexagem dos espermatozóides com aquele usado na rotina de produção *in vitro* de embriões bovinos quanto ao seu efeito na criotolerância dos embriões produzidos.

5) Avaliar a criotolerância dos ePIV do sexo feminino pela taxa de eclosão pós descongelação.

6) Avaliar a eficiência dos gradientes desenvolvidos pela verificação do desvio da proporção sexual pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) dos embriões produzidos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

A produção, congelação e descongelação dos embriões, foi desenvolvida no Laboratório de produção *in vitro* de embriões da Empresa Cenatte Embriões, em Pedro Leopoldo (MG).

A padronização do gradiente de sexagem e a técnica da PCR foram realizadas nos Laboratórios de Cultivo e de Biologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal (SP).

O experimento consistiu de 4 tratamentos:

-Tratamento controle: neste tratamento o sêmen não foi centrifugado em gradiente descontínuo de densidade de PercollTM e os ePIV que não atingiram o estágio de Blastocisto (Bl) e Blastocisto expandido (Bx), ou seja, as mórulas e os blastocistos iniciais (Bi) foram sexados pela PCR;

-Sexado: o sêmen foi centrifugado em gradiente descontínuo de densidade de PercollTM e os embriões que não atingiram o estágio de Bl e Bx, foram sexados pela PCR;

-Controle destinado a criopreservação: o sêmen não foi centrifugado em gradiente descontínuo de PercollTM e os ePIV, nos estádios de Bl e Bx, foram congelados, descongelados, avaliados quanto a taxa de eclosão e sexados pela PCR;

-Sexado destinado a criopreservação: o sêmen foi centrifugado em gradiente descontínuo de Percoll e os ePIV, nos estádios de Bl e Bx, foram congelados, descongelados, avaliados quanto a taxa de eclosão e sexados pela PCR.

Utilizou-se sêmen de touro da raça Nelore (*Bos indicus*) congelado em palhetas de 0,25ml, obtido de empresa especializada em congelação de sêmen bovino.

5.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos foram colhidos em abatedouros e transportados para o laboratório em solução salina a 30-33°C.

Os folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 19-g acoplada a seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e após 15 minutos os oócitos do sedimento transferidos para placa de poliestireno de 60mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico.

Selecionou-se os COCs com pelo menos 4 camadas de células e ooplasma de coloração uniforme, ou seja, somente graus 1, 2 e 3. Oócitos considerados desnudos e atrésicos foram descartados.

5.2. Tratamento controle e controle destinado a criopreservação

5.2.1. Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75µg de Kanamicina/mL) e uma vez em meio de maturação constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75µg de Kanamicina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB.

Transferiram-se no máximo 20 estruturas por microgota de 100µl. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (Figura 01).



Figura 01: Foto digitalizada de oócitos de bovinos após aspiração e 24 horas de maturação *in vitro*.

5.2.2.Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 24 horas após o início da maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35-37°C por 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre um gradiente de Percoll™ de duas camadas (a camada inferior contendo 90% e a superior contendo 45% de Percoll™) à temperatura ambiente e centrifugado a 900 x g de força de centrifugação durante 30 minutos, a fim de sedimentar os espermatozóides viáveis.

O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade e vigor espermática. A concentração final foi ajustada para 25 milhões de espermatozóides vivos por mL de meio de fecundação TALP-FIV, o protocolo utilizado

foi o do padrão do laboratório do Departamento de Reprodução Animal da Unesp campus de Jaboticabal. Aproximadamente 100 mil espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100µl de meio TALP-FIV.

Os oócitos foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos e uma vez em meio TALP-FIV. Adicionou-se 20 oócitos por gota de FIV e incubou-se a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

5.2.3.Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram agitados na gota de FIV com o auxílio de pipeta ajustada para 50 µl, para que as células do *cumulus* e os espermatozóides restantes se soltassem. Lavou-se os zigotos por três vezes em meio SOF sem SFB e sem glicose e transferiu-se para placas de quatro poços contendo 500µl do mesmo meio utilizado para lavagem após a fecundação.

Cultivou-se no máximo 70 zigotos por poço, em estufa com atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C.

A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados 24 horas e 7 dias após a fecundação, respectivamente.

5.3.Tratamento sexado e sexado destinado a criopreservação

A maturação foi feita como no tratamento controle.

5.3.1.Fecundação *in vitro*

Uma hora antes do início da fecundação *in vitro* o gradiente de sexagem foi preparado de acordo com a seguinte metodologia:

5.3.1.1.Preparação do gradiente descontínuo de densidade

Para a preparação do gradiente descontínuo de densidade, foi necessário preparar duas soluções: a solução estoque e a solução de DMEM 1 vez concentrado (DMEM 1X).

A solução estoque (SE 90%, densidade 1,123g/mL) foi preparada diluindo-se 9 partes de sílica coloidal modificada (Percoll™ densidade 1,30 g/mL) em uma parte de DMEMⁱ (densidade 1,058 g/mL; 1:9, v/v) concentrado 10 vezes (DMEM 10X) complementado com 0,01 g/L de antibióticoⁱⁱ, 6mM de HEPESⁱⁱⁱ; pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H₂O. O DMEM 10X foi preparado diluindo-se a quantidade de pó necessária para preparar 1 litro, em 100 mL de água ultra pura bidestilada do Sistema Milli Q^{iv}.

Em seguida a solução estoque foi filtrada em membrana com poros de 0,22μ e estocada em temperatura entre 4 a 6°C.

O DMEM 1 X foi preparado segundo instruções do fabricante. Em seguida, foi filtrado em membrana com poros de 0,22μ e estocado em temperatura entre 4 a 6°C.

Para obter o gradiente descontínuo de densidade, soluções isotônicas (280-320 mOsm/Kg de H₂O) com densidades diferentes foram preparadas diluindo-se diferentes porções de SE (Percoll™ 90%) em meio DMEM 1X, complementado com antibiótico, 6mM de HEPES e 0,3% de albumina sérica bovina fração V (BSA^v); pH 7,4. O gradiente descontínuo de Percoll™ foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, as camadas de densidades diferentes, em tubos cônicos^{vi} de poliestireno de 15mL com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável^{vii}.

O gradiente 14 (G14), o qual foi utilizado neste estudo, foi composto por 3 camadas de 3 mL cada, de soluções de Percoll™ com densidades variando entre 1,110 g/mL; 1,115 g/mL; 1,123 g/mL (80, 85, e 90% de Percoll™ respectivamente) (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 2000) (Figuras 02 e 03).

Logo após a descongelação, uma amostra do sêmen foi avaliada quanto a motilidade, concentração e vigor dos espermatozóides e o restante depositado sobre o gradiente (Figura 05).



Figura 02 e 03: Foto digitalizada da preparação do gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.

ⁱDubelcco`s Modified Eagle`s Medium, GIBCO, 12.800-017, stonehan, USA

ⁱⁱAmicacima

ⁱⁱⁱSigma, Chemical Co., H3375, Saint Louis, USA

^{iv}Millipore, Billerica, USA

^vSigma Chemical Co., H7006, Saint Louis, USA

^{vi}Corning, 430053, New York, USA

^{vii}Labsystems, 4540, Helsinki, Finland

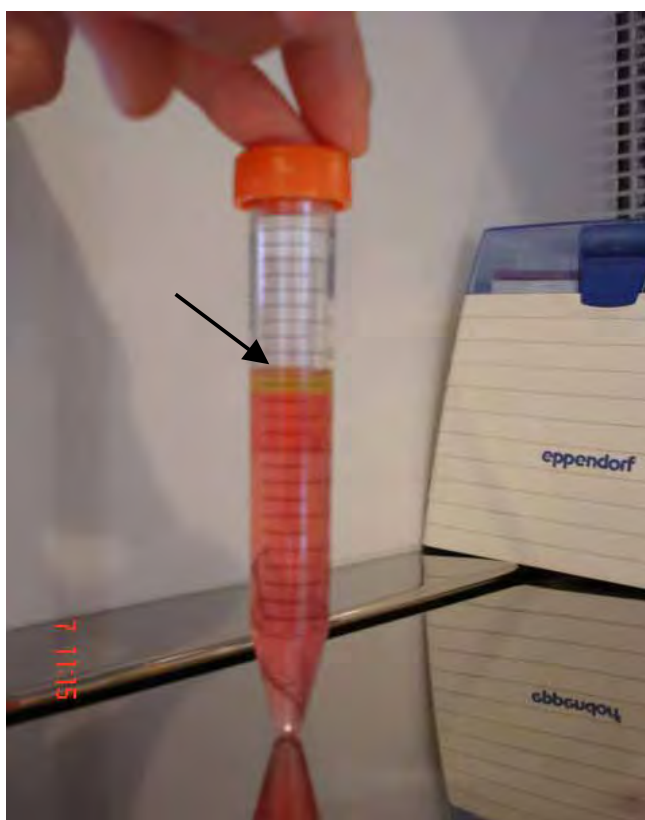


Figura 04: Foto digitalizada do sêmen descongelado depositado sobre o gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.

5.3.1.2. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides no gradiente de sexagem

Vinte a 40 milhões de espermatozóides por 0,25 mL foram depositados sobre cada gradiente de sexagem. O gradiente foi centrifugado a 1800 x g em rotor horizontal, por 20 minutos, a 22°C. O sobrenadante do tubo foi retirado com auxílio de pipeta de volume ajustável. Os espermatozóides do sedimento foram avaliados quanto a motilidade, concentração e vigor antes de serem utilizados para a fecundação *in vitro* (Figura 05).

A concentração final foi ajustada para 25 milhões de espermatozoides vivos por mL de meio de fecundação TALP-FIV. Foram adicionados 20 óocitos por gota de FIV e incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.



Figura 05: Foto digitalizada do sedimento de sêmen formado após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.

O cultivo *in vitro* foi feito como no tratamento controle.

5.4. Congelação dos embriões dos tratamentos controle e sexado destinados a criopreservação

A congelação dos embriões foi feita de acordo com o protocolo usado pelo laboratório do Cenatte Embriões.

Somente blastocistos no estágio de Bx e BI foram congelados (Figura 06).

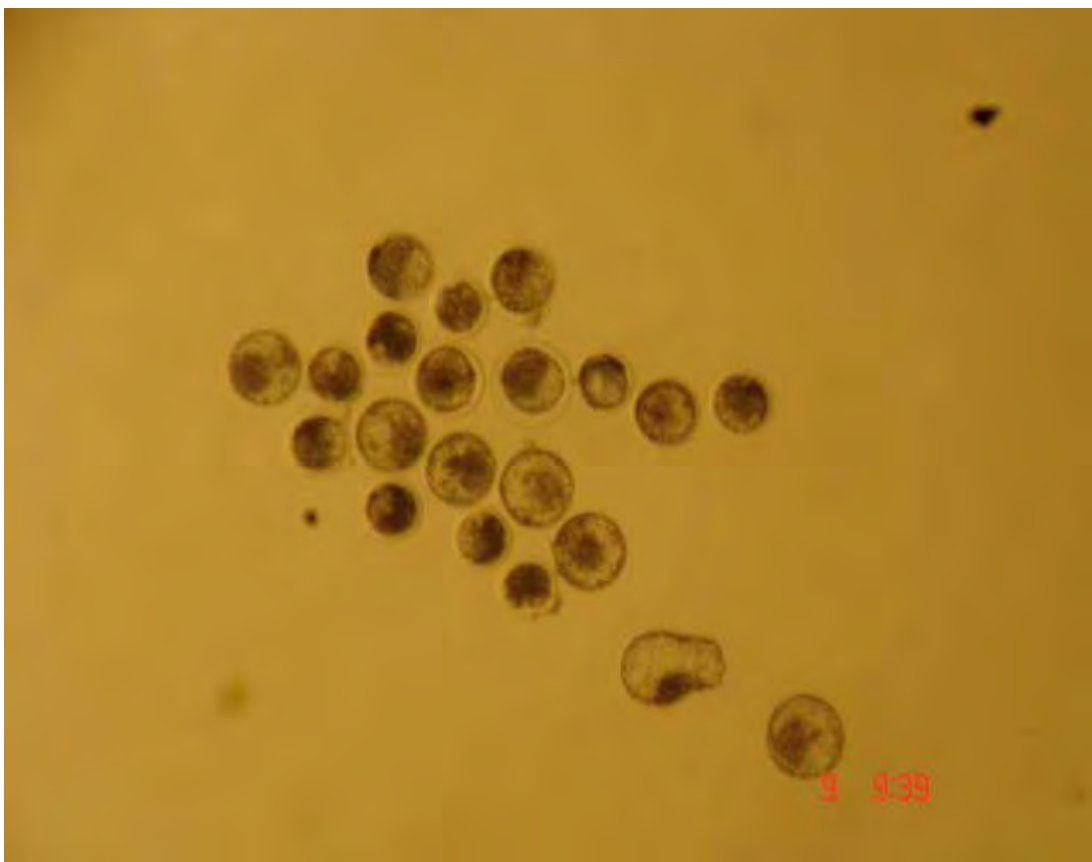


Figura 06: Foto digitalizada dos embriões no sétimo dia de cultivo *in vitro* após a fecundação.

Empregou-se como crioprotetor o glicerol a 1,4M.

Os embriões foram submetidos a 4 banhos de PBS com 20% de SFB, em seguida lavados em solução de equilíbrio (PBS com glicerol 10%, sacarose a 0,25M, 20% de SFB e 0,4% de BSA) por 15 minutos. Permaneciam em solução de congelação (PBS + 20% de SFB, 0,4% de BSA e glicerol a 10%) por mais 15 minutos.

Foram envasados em palhetas de 0,25mL devidamente identificadas quanto ao tratamento e o estágio do embrião. Cada palheta era preenchida por três colunas, a primeira e a terceira com solução de PBS com 25M de sacarose e a segunda contendo o embrião na solução de congelação.

Foram congelados em máquina de congelação TK 1000. A temperatura inicial da máquina de congelação foi programada para -7° C, o “seeding” feito após 1 minuto e a temperatura estabilizada a -7°C por 10 minutos. A curva de congelação foi feita a 0,3°C por minuto até atingir -32°C. Após o processo de congelação os embriões foram estocados em nitrogênio a -196°C (Figuras 07 e 08).

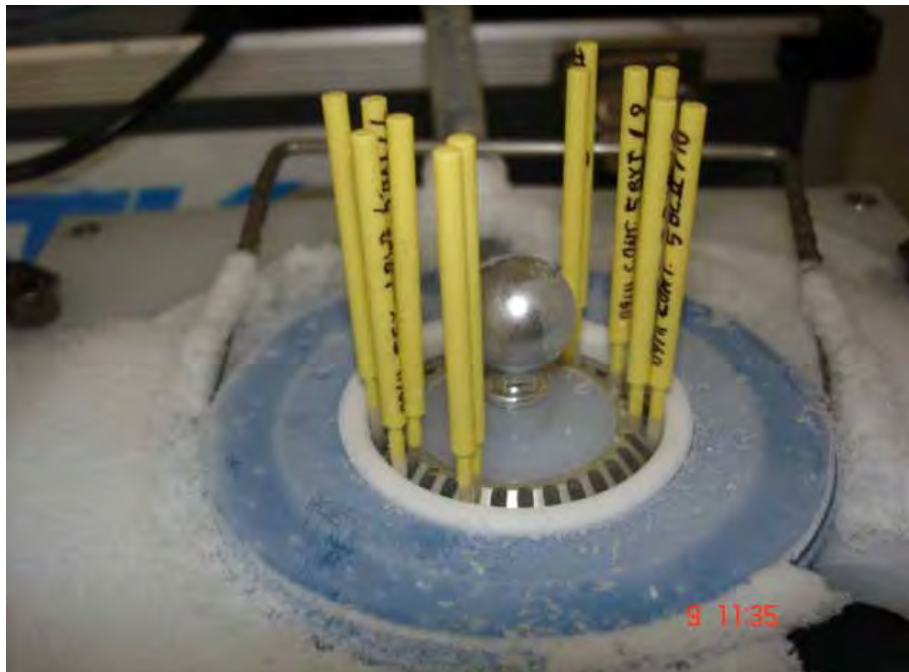


Figura 07: Foto digitalizada das palhetas identificadas contendo os embriões produzidos *in vitro* e acondicionadas no equipamento utilizado para a congelação.



Figura 08: Foto digitalizada do equipamento utilizado para a congelação dos embriões produzidos *in vitro*.

5.5. Descongelação dos embriões dos tratamentos controle e sexado destinados a criopreservação

A descongelação dos embriões também foi feita de acordo com o protocolo usado pelo laboratório do Cenatte Embriões.

As palhetas foram expostas à temperatura ambiente por 10 segundos e 20 em água a 30°C e agitadas para misturar as três colunas e promover a diluição do crioprotetor. Os embriões foram retirados da palheta e depositados em placa de poliestireno onde permaneciam por 1 a 2 minutos. Em seguida, foram lavados em uma gota de 200µl de PBS com 0,25 M de sacarose, por 5 minutos. Passados por quatro banhos de PBS com SFB e BSA e transferidos para gotas de 20µL de meio de cultivo (TCM 199 com 20% de SFB), individualmente. Foram cultivados em estufa com atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% N₂, 100% de umidade saturada e temperatura de 38,5°C.

A taxa de eclosão foi avaliada com 24 e 48 horas de cultivo.

5.6. Análise dos resultados

5.6.1. Verificação do desvio da proporção sexual pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos embriões bovinos

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

Os dois pares de "primers" escolhidos para a seqüência específica do cromossomo Y foram: "Primer" 1: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3'; "Primer" 2: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'.

O "primer" 1 amplificou uma seqüência de 210 pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI *et al.*, 1989) e o "primer" 2 amplificou uma seqüência de 196 pb em machos (LUZ *et al.*, 2000).

Foi utilizado um "primer" específico para o DNA bovino: "primer" 3 - 5' - AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e 5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'. Este "primer" amplificou uma seqüência de 280 pb, repetida no genoma bovino (ELLIS & HARPOLD, 1986; ELLIS *et al.*, 1988).

Cada embrião foi colocado em um microtubo de 200µl contendo 10µl de água ultra pura do Milli-Q autoclavada, posteriormente foram congelados em nitrogênio por 20-30s e armazenados em freezer a -20°C.

Antes da PCR, foi adicionado 5µg de Proteinase K por embrião, em seguida os embriões foram submetidos a uma incubação de 37°C por 60 minutos. Logo após, os embriões foram divididos em duas amostras e submetidos a duas reações distintas:

- a primeira contendo a seqüência autossômica (280pb) e a Y-específica (210pb);
- a segunda reação composta por outra seqüência Y-específica (196pb).

As amplificações foram realizadas em Termociclador PTC - 100 (M.J. Research, Inc. - Waltham, M.A. - USA). Os produtos das amplificações foram submetidos a eletroforese em gel de 3% de agarose, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Os embriões foram identificados como fêmeas quando somente o produto de 280 pb foi visualizado. A presença de duas bandas (280 e 210 pb) na amostra indicou que os embriões eram do sexo masculino. Este resultado foi confirmado somente quando uma banda de 196 pb era visualizada. Os géis eram analisados utilizando-se equipamento de documentação fotográfica STRATAGENE (Eagle Eye Software) (Figura 09).

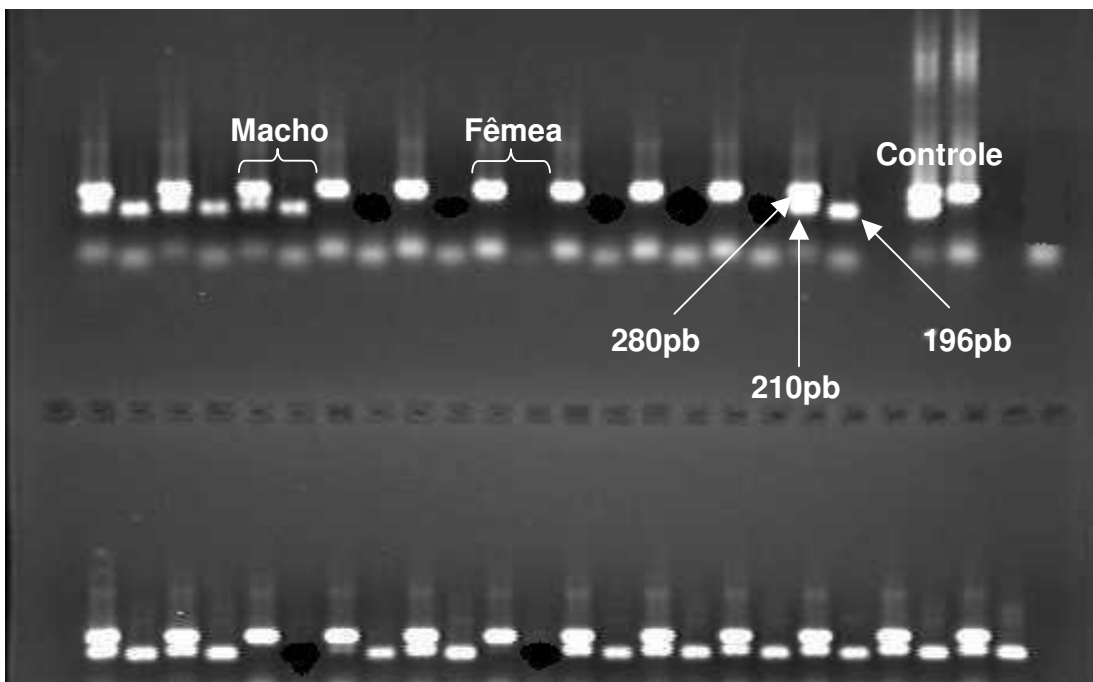


Figura 09: Foto digitalizada do gel de agarose contendo os produtos da PCR em que está identificado embrião como macho quando foram visualizadas as bandas de 280, 210 e 196 pb e como fêmea quando somente a banda de 280 pb foi visualizada.

5.6.2. Desvio da proporção sexual dos embriões

Com os resultados do sexo genético conseguido pela PCR, foi realizada análise estatística pelo teste do Qui-quadrado (nível de significância de 5%) para verificar a acuidade da sexagem de espermatozoides, levando-se em consideração o desvio da proporção sexual do grupo controle.

5.6.3. Criotolerância dos embriões

Com os resultados obtidos pela taxa de eclosão dos embriões pós descongelamento, foi realizada análise estatística pelo teste do Qui-quadrado (nível de significância de 5%) para verificar a maior criotolerância dos embriões do sexo feminino, levando-se em consideração o desvio da proporção sexual e a taxa de eclosão do tratamento sexado em relação ao controle.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação do sêmen

Com a padronização do método de sexagem de espermatozoides por gradiente descontínuo de densidade de PercollTM e com o uso de sêmen congelado de boa qualidade, conseguiu-se obter resultados satisfatórios na recuperação, motilidade e vigor dos espermatozoides.

Foi possível recuperar até 25% dos espermatozoides colocados sobre cada gradiente. A motilidade após a centrifugação foi de cerca de 72% e vigor 5 (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação do sêmen de touro da raça Nelore quanto a motilidade e vigor pós descongelamento; concentração, motilidade, vigor e porcentagem de espermatozoides após a centrifugação em gradiente descontínuo de PercollTM

Repetições	1	2	3	4	5
Número de doses descongeladas	1	1	2	1	1
Concentração de sptz sobre o gradiente ($\times 10^6$)	22,5	22,5	43,75	23,75	25,625

o gradiente (x10 ⁶)					
Motilidade pós descongelamento(%)	60	60	60	60	70
Vigor (1-5)	4	3	3	3	4
Concentração após a centrifugação no gradiente (x10 ⁶)	3,75	4,44	4,875	3,75	6,25
Porcentagem Recuperada	16,66	19,73	11,14	15,79	24,4
Motilidade (%)	60	80	70	80	70
Vigor (1-5)	4	5	5	5	5

Em todas as repetições, a taxa de recuperação dos espermatozóides da fração inferior do gradiente de densidade (prováveis portadores do cromossomo X) foi em média 4,6 milhões de espermatozóides (17,54%). De acordo com Van Munster *et al.* (1999), esta taxa de recuperação seria um forte indício que, em média, os gradientes testados foram eficientes para separar os espermatozóides portadores do cromossomo X daqueles portadores do Y. Os autores demonstraram que métodos de sexagem de espermatozóides em que as taxas de recuperação estivessem entre 10 e 20%, permitem atingir acuidade de sexagem de até 70%. Nesse trabalho a acuidade máxima foi de 65%. Isso pode ser explicado pela influência da PIV no desvio para o sexo masculino, como pode ser observado no grupo controle e confirmado por outros autores (IWATA *et al.*, 2007).

6.2. Produção *in vitro* de embriões

A taxa de clivagem e produção total de embriões dos tratamentos sexado e controle, de todas as repetições realizadas, estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Taxas de clivagem e produção total de embriões

Tratamentos	Número Total de oócitos	Taxa de clivagem	Número Total de embriões produzidos
-------------	-------------------------	------------------	-------------------------------------

Sexados	373	217 (58,2)	133 (35,65)
Controle	268	171 (63,8)	100 (37,31)

A utilização dos espermatozoides separados pelo gradiente de densidade na fecundação *in vitro* permitiu a clivagem de cerca de 58% dos oócitos e o desenvolvimento de 35% até o estágio de blastocisto. Esses resultados estão de acordo com aqueles publicados por Parrish *et al.* (1995) que obteve taxa de clivagem e de desenvolvimento de 42% e 35%, respectivamente.

A porcentagem de embriões do sexo masculino e feminino (identificados pela PCR) dos tratamentos sexado e controle que não foram congelados por não atingirem o estágio de BI ou Bx está representada na tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de embriões do sexo masculino e feminino (identificados pela PCR) dos tratamentos sexado e controle que não foram congelados por não atingirem o estágio de BI ou Bx.

Tratamentos	Mo e Bi submetidos a PCR	Porcentagem de machos	Porcentagem de fêmeas
Sexados	20	7 (35,00%)	13 (65,00%)
Controle	14	8 (57,14%)	6 (42,86%)

Mo=mórula, Bi=blastocisto inicial

Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos sobre a porcentagem de embriões de cada sexo, possibilitou verificar que houve um maior número de embriões do sexo feminino quando os espermatozoides foram centrifugados no gradiente de sexagem.

O total de embriões congelados e descongelados e submetidos a cultivo para verificação das porcentagens de machos e fêmeas (eclodidos e não eclodidos) está representado na tabela 4;

Tabela 04. Porcentagem de machos e fêmeas dos tratamentos sexado e controle após a PCR do número total de embriões (Bl e Bx) eclodidos ou não após a congelação e descongelação

Tratamentos	Total de embriões eclodidos ou não após descongelação e submetidos a PCR	Porcentagem Total de Machos	Porcentagem Total de Fêmeas
Sexados	90	35 (38,88%)	55 (61,12%)
Controle	68	39 (57,35%)	29 (42,65%)

No presente trabalho, demonstrou-se que a centrifugação de espermatozoides bovinos em gradiente composto por 3 camadas de densidades diferentes foi eficiente na separação dos espermatozoides, originados de sêmen congelado, portadores de cromossomo X, com acuidade de cerca de 61%. Este resultado está de acordo com o relatado por Hossepian de Lima (1998), que obteve em 13 diferentes gradientes uma acuidade entre 61 a 70% usando a centrifugação de sêmen congelado em densidades descontínuas de Percoll™.

Os embriões eclodidos após a descongelação e cultivo bem como a porcentagem de machos e fêmeas após a PCR, estão representados na tabela 5.

Tabela 05. Porcentagem de machos e fêmeas dos tratamentos sexado e controle após a PCR dos embriões eclodidos pós congelação, descongelação e cultivo

Tratamentos	BL e BX Congelados e Descongelados	Degenerados Pós Descongelação	Bl e Bx Eclodidos Pós Descongelação	Porcentagem de Machos	Porcentagem de Fêmeas
Sexados	95	5	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)
Controle	68	0	8	4 (50%)	4 (50%)

Bl=blastocisto, Bx=blastocisto expandido

A baixa taxa de eclosão pós descongelação pode ser explicada pelo fato de que o processo de congelação diminui a viabilidade embrionária, o que pode ser atribuído a danos físicos e químicos que ocorrem durante o processo de criopreservação.

As lesões causadas dependem de vários fatores incluindo: o tamanho e a forma da célula, a permeabilidade da membrana e a qualidade e sensibilidade dos oócitos e dos embriões (VAJTA & KUMAYAMA, 2006). Esses danos podem ser conseqüências de ações tóxicas do crioprotetor que invade a célula do embrião durante o processo de solidificação formando cristais de gelo. Isso pode levar a célula à morte afetando a viabilidade e o desenvolvimento do embrião (MÁRQUEZ-ALVARADO *et al.*, 2004).

Além disso, os passos da criopreservação levam a severas alterações na ZP. A principal delas é a redução da superfície dos poros desta membrana, o que prejudica o transporte de nutrientes do meio para as células embrionárias e o de metabólitos das células para o meio, causando danos irreversíveis e prejudicando o desenvolvimento embrionário (MOREIRA DA SILVA & METELO, 2005). Os autores confirmaram que a atividade metabólica do embrião reflete sua capacidade de carregar funções vitais necessárias para o seu bem estar e é um parâmetro importante para a avaliação de sua qualidade.

Outra provável explicação para a baixa taxa de eclosão é que nesse estudo, no sistema de cultivo, não foi utilizado SFB para evitar o desvio da proporção sexual para machos (RIZOS *et al.*, 2003). Em outros estudos foi observado que embriões cultivados *in vitro* em meio sem SFB são mais criotolerantes que aqueles cultivados em meio com. A maioria dessas observações estão associadas com a grande quantidade de lipídeos citoplasmáticos presentes nestes embriões. Quanto mais e maiores as gotas de lipídeos, menor é a criotolerância dos embriões (GEORGE & SEIDEL JR, 2006; MUCCI *et al.*, 2006). Os mesmos autores relataram que o uso do etossulfato de fenazina (PES), um forte receptor de elétron que oxida o NADPH rapidamente, aumenta, ainda mais, a criotolerância dos embriões cultivados em meio sem SFB. Eles conseguiram uma taxa de sobrevivência dos embriões pós descongelação de 94%, quando estes foram cultivados em meio sem soro e suplementados com PES, contra uma taxa de 61% quando os embriões foram cultivados em meio com 10% de soro. Isso ocorre porque o NADPH é essencial para a síntese de lipídeos, principalmente longas cadeias de ácidos graxos.

Uma alternativa para minimizar a ausência do SFB seria a substituição da glicose pela frutose no meio de cultivo durante o desenvolvimento de embriões. Essa substituição produziu 13% a mais blastocistos que o meio com glicose (BARCELÓ-FIMBRES & SEIDEL JR, 2007). Os autores relatam não estar totalmente esclarecidos porque a frutose é superior a glicose, mas parece que essa hexose promove a redução de quantidade de lipídeo no citoplasma celular.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação a maior criotolerância dos embriões do sexo feminino (Tabela 05). A proporção sexual de 50% e 62,12% de blastocistos eclodidos nos tratamentos controle e sexado, respectivamente, diferiu daquela observada por Tomita (2003) que congelou em glicerol 1,4M somente blastocistos expandidos. Estes foram transferidos para receptoras e foram diagnosticadas 74 gestações de 171 transferências. Cem por cento dos bezerros oriundos de embriões PIV descongelados eram do sexo masculino. Uma possível explicação é que, como os embriões do sexo masculino se desenvolvem mais rápido que os do sexo feminino, foram selecionados para a criopreservação pela morfologia e também pelo estágio de desenvolvimento (blastocisto expandido).

A maior criotolerância de embriões do sexo feminino foi relatada por Morton *et al*, (2006) que produziram embriões de ovelhas a partir de sêmen sexado, congelaram, descongelaram e transferiram os embriões que sobreviveram pós descongelação. Foram diagnosticadas 7 prenhez, aos 63 dias de gestação, de 17 transferências. Todos os fetos eram do sexo feminino. Da mesma forma, Agca *et al*, (1994) relataram uma taxa de reexpansão de embriões produzidos *in vitro*, biopsiados para sexagem e vitrificados de 85%. De 623 mórulas, 58% atingiram o estágio de blastocisto e foram vitrificados. Destes, 158 eram fêmeas, 139 machos e em 62 não foi possível identificar o sexo. Deste total de embriões do sexo feminino, 148 foram transferidos. Nasceram 34 bezerros e 5 deles eram machos.

Xu *et al*. (2006) também relataram uma maior criotolerância de embriões produzidos a partir de sêmen bovino sexado e vitrificados. De 458 bezerros nascidos, 442 eram fêmeas e 99% delas eram normais.

A sexagem de espermatozóides, fecundação *in vitro*, e criopreservação, são biotecnologias que, quando associadas, representam um grande potencial para a indústria de produção *in vitro*. Porém a baixa tolerância aos processos de criopreservação de ePIV indicam a necessidade de conhecimento da criobiologia desses embriões.

7. CONCLUSÕES

a) Foi possível inserir esta técnica na rotina da produção *in vitro* de embriões bovinos, pois uma hora antes da FIV o gradiente pôde ser preparado e separou os espermatozóides viáveis enriquecidos com 65% de espermatozóides X.

b) O gradiente descontínuo de densidade de PercollTM foi eficiente no desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino.

c) O desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino não aumentou a taxa de eclosão após a descongelação.

d) O processo de centrifugação não afetou a qualidade dos espermatozóides, uma vez que a taxa de clivagem (58%) e de embriões produzidos (35%) foi satisfatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, MAZNI AO, RUTLEDGE JJ. Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. **Theriogenology** 1994, 41:154 abstr.

ANDERSSON, M; TAPONEN, J; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**. 2006. v. 41, n. 2, p. 95-97.

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

ASBIA- Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório Anual, 2000.

AVELINO, K. B. Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária. 2004. 93f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – FCAV, UNESP, Jaboticabal, 2004.

BARCELO´-FIMBRES, M.; SEIDEL Jr, G.E.; Effects of Fetal Calf Serum, Phenazine Ethosulfate and Either Glucose or Fructose During In Vitro Culture of Bovine Embryos on Embryonic Development After Cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, 2007.

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

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

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

ELLIS, S.B.; HARPOLD, M.M. Nucleic acid probes for prenatal sexing. International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) **World Intellectual Property Organization.Publication**, nº. WO 86/07095.1986

ELLIS, S.B.; BONDIOLI, K.R.; WILLIAMS, M.E.; PRYOR, J.H.; HARPOLD, M.M. Sex

determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**. 1988. v. 29, p. 242.

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

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**. 2003. v. 60, p. 943-952.

GEORGE, E.; SEIDEL JR. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**. 2006. v. 65, p. 228–235.

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

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade. São Paulo: Instituto de Biociências, USP, 1998. 89 p. (Doutorado em Genética).

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

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.F.P.D-T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B. MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y- bearing bovine

spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**. 2000. v. 53, n. 1, p. 480.

JIMÉNEZ, A.; MADRID-BURY, N.; FENANDÉZ, R.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUITIÉRREZ-ADÁN, A. Hyperglycemia–Induced Apoptosis Affects Sex Ratio of Bovine and Murine Preimplantation Embryos. **Molecular Reproduction Development**. 2003. v. 65, p. 180-187.

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

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

JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R. Sex selection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**. 1999. v. 52, p. 1323-1342.

KIMURA, K.; SPATE, L.D.; GREEN, M.P.; ROBERTS, R.M. Effects of Oxidative and Inhibitors of the Pentose Phosphate Pathway on Sexually Dimorphic Production of IFN- τ by Bovine Blastocysts. **Molecular Reproduction Development**. 2004. v. 68, p. 88-95.

KHURANA, N. K.; NIEMANN H. Effects of criopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo* **Theriogenology**. 2000. v. 54, p.313-326.

LARSON, M.A.; KUBISCH, H.M. The effects of group size on development and interferon- τ secretion by in-vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. **Human Reproduction**. 1999. v. 14, n. 8, p. 2075-2079.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of Peroxiredoxins in Bovine Oocytes and Embryos Produced In vitro. **Molecular Reproduction Development**. 2004. v. 69, p. 243-251.

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

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

MÁRQUEZ-ALVARADO, Y.C.; GALINA, C.S.; CASTILLA, B.; LEO´, H.; MORENO-MENDOZA, N.; Evidence of Damage in Cryopreserved and Fresh Bovine Embryos using the Tunel Technique. **Reproduction for Domestic Animal**. 2004. v. 39, p. 141-145.

MOREIRA DA SILVA, F. & METELO, R.; Relation between Physical Properties of the Zona Pellucida and Viability of Bovine Embryos after Slow-freezing and Vitrification. **Reproduction for Domestic Animal**. 2005. v.40, p. 205-209.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG,B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C; RATH, D.; EVANS,G.; LUCAS-HAHN,A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA Expression Patterns in Bovine Blastocysts After Fertilisation In Vitro Using Flow-Cytometrically Sex-Sorted Sperm. **Molecular Reproduction and Development**. 11 jan. 2007, em impressão.

MORTON, K.M.; ROWE, A.M.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen

thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**. 2006. v. 65 p. 1333–1345.

MUCCI, N.; ALLER J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**. 2006. v. 65 p. 1551–1562.

NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine embryos from livestock current status and research needs. **Theriogenology**. 1991. v. 35, p. 109-24.

NICHOLAS, F.W., SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. 1983. **Animal Production**, v.36, p.341-53.

PARRISH, J.J., KROGENAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and embryonic development. 1995. **Theriogenology**, v.44, p.859-69.

PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vivo* and *in vitro* following transfer. **Animal Reproduction Science**. 2000. v.58 p. 9-22.

PUGH, P. A.; ANKERSMITH, A. E. L.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H. L.; Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effect of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post thaw survival. **Theriogenology**. 1998. v. 50, p.495-506.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of

serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**. 2003. v. 68, n. 1, p. 236-243.

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

SANG-RAE, C.; SEONG-KEUN, C.; SUNG-LIM, L.; HYO-JONG, L.; SANG-YONG, S.; GYU-JIN, R. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum-free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. 2002. v. 19, n 10.

SEIDEL, G.E.Jr.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm – overview. **Theriogenology**. 1999. v. 52, n. 8, p. 1267-72.

TAYLOR, C.S. Food efficiency in traditional and Sex controlled systems of beef production. **Animal Production**. 1985. v. 40, p. 401- 440.

TOMITA, S. Y. Viabilidade prática e custo da indução de gestações gemelares em bovinos de corte, a partir de embriões produzidos in vitro e criopreservados para transferência direta. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Oving cryopreservation systems. **Theriogenology**. 2006 v. 65, p. 236–244.

VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E.; BRANDFORD-OLTENACU, E.A. **Genetics for the Animal Science**. New York: W.H. Freeman, 1987. cap.13, p.287-313.

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

Xu, J.; Guo, Z.; Su, L.; Nedambale, T.L.; Zhang, J.; Schenk, J.; Moreno, J.F; Dinnye's, W.; Ji, W.; Tian, C.X.; Yang, X.; Du, F. Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. **American Dairy Science Association**. 2006. v. 89, p. 2510 – 2518.

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

WINDSOR, D.P.; EVANS, G.; WHITE, I.G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Reproduction Fertility Development**. 1993. v. 5, n. 2, p. 155-171.
