

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



**Dissertação**

**MINIGRADIENTES ISOLATE E OPTIPREP  
COMO ALTERNATIVAS AO GRADIENTE  
DE PERCOLL NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS**

**Liziane Lemos Vianna**

Pelotas, 2011

**Liziane Lemos Vianna**

**Minigradientes isolate e optiprep como alternativas  
ao gradiente de percoll na produção *in vitro* de  
embriões bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2011

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V617m

**Vianna, Liziane Lemos**

**Minigradientes isolate e optiprep como alternativas ao gradiente de percoll na produção in vitro de embriões bovinos / Liziane Lemos Vianna. – Pelotas, 2011. – 33f. ; tab. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Reprodução animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2011. - Orientador Marcio Nunes Corrêa ; co-orientador Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro.**

1.Veterinária. 2.Gradientes de seleção espermática.  
3.Criopreservação. 4.Produção de embriões bovinos *in vitro*.  
5.Proporção sexual. 6.Bovinos. 7.Qualidade espermática.  
I.Corrêa, Marcio Nunes. II.Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli.  
III.Título.

CDD: 636.20824

**Banca examinadora:**

Marcio Nunes Corrêa, Dr., Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Maria Gabriela Tavares Rheingantz, Dra., Universidade Federal de Pelotas

Rafael Gianella Mondadori, Dr., Universidade Federal de Pelotas

José Luiz Rigo Rodrigues, Dr., Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária e a CAPES pela bolsa de estudos oferecida durante o curso.

Aos meus orientadores Marcio Nunes Corrêa e Ligia M. Cantarelli Pegoraro, pela compreensão, pela paciência, ensinamentos, confiança, amizade e principalmente pela oportunidade.

Aos meus co-orientadores Luiz Francisco Machado Pfeifer, Eduardo Schmitt e Arnaldo Vieira pela ajuda, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino, Extensão em Pecuária (NUPEEC), pela amizade e companheirismo.

Aos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado: Ledi Bitencourt, Jorgea Pradieé, Alexander, Elisa, Carla Martins, Mauren Vasconcelos, Laís, Paola pela oportunidade de conviver com vocês, pela amizade, ajuda e companheirismo.

A Margot Dode, a Dra Maria Gabriela Rheingantz e ao Gabriel pela ajuda e pelo tempo dedicado.

Ao Frigorífico Marfrig, a Lagoa da Serra e a Nutricell, pelo auxílio no experimento, com o fornecimento dos ovários, sêmen e meios, respectivamente.

Aos meus amigos Ana, Guga, Marília, Maira e Henrique pelo incentivo, carinho e principalmente por serem meus amigos.

A minha prima e amiga Karina Goularte pela amizade, disposição e ajuda.

Ao meu irmão Ricardo Lemos Vianna, pelo carinho, amizade e incentivo.

Ao meu namorado Augusto Rassier pelo companheirismo, amor, amizade, incentivo e pela compreensão nos momentos de falta.

Ao meu pai José Dias Vianna Filho pelo carinho, amor, incentivo, confiança e por me proporcionar este momento.

## Lista de Figuras

- Figura 1 (A) Integridade de membrana (FDA-IP): membrana lesada (L); membrana semi-lesado (SL); membrana íntegra (IN). (B) Integridade de acrossoma (FITC-PNA): morto com acrossoma reagido (MR); morto com acrossoma íntegro (MI); vivo com acrossoma reagido (VR)..... 21
- Figura 2 Separação dos produtos, amplificados por PCR, em gel de agarose a 2,5%. CPM: controle do peso molecular; C-: controle negativo; CM: controle de macho; CF: controle de fêmea..... 23

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Cinética espermática antes (controle) e após a passagem pelos gradientes (Média $\pm$ EPM).....	22
Tabela 2	Integridade de acrossoma e integridade de membrana antes (controle) e após a passagem pelos gradientes (Média $\pm$ EPM).....	22
Tabela 3	Taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário em D7 e D8.....	23
Tabela 4	Sexo dos embriões produzidos <i>in vitro</i> .....	24
Tabela 5	Sobrevivência <i>in vitro</i> após a vitrificação de blastocistos expandidos.....	24

## Sumário

Agradecimentos .....	3
Lista de figuras .....	4
Lista de tabelas .....	5
Sumário .....	6
1. Introdução geral .....	8
2. Objetivo geral .....	10
2.1 Objetivos específicos .....	10
3. Artigo: Minigradientes Isolate e Optiprep como alternativas ao Gradiente de do Percoll na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	11
Resumo .....	12
Abstract .....	13
4. Introdução .....	13
5. Materiais e Métodos .....	14
5.1 Meios utilizados .....	14
5.2 Coleta, seleção e maturação <i>in vitro</i> dos complexos cumulus-oócitos .....	15
5.3 Seleção espermática .....	15
5.3.1 Preparação dos gradientes e tratamentos .....	15
5.3.2 Avaliação espermática .....	16
5.4 Fecundação <i>in vitro</i> .....	17
5.5 Cultivo <i>in vitro</i> e avaliação embrionária .....	18
5.6 Sexagem dos embriões .....	18
5.7 Vitriificação dos embriões .....	19
5.8 Análises estatísticas .....	19
6. Resultados .....	20

6.1 Avaliação espermática .....	20
6.2 Clivagem e desenvolvimento embrionário.....	21
6.3 Proporção sexual .....	23
6.4 Sobrevivência após a vitrificação .....	24
7. Discussão.....	24
8. Conclusões.....	27
Referências .....	27
Referências gerais .....	29

## 1. Introdução geral

A produção de embriões *in vitro* (PIV) em bovinos é uma biotécnica que vem sendo mundialmente utilizada como alternativa para acelerar e intensificar o melhoramento genético dos rebanhos comerciais. Além disso, é amplamente utilizada em pesquisas que visam esclarecer questões ligadas ao controle endócrino, molecular e vias metabólicas que regulam o desenvolvimento embrionário precoce (Galli et al, 2003). Resumidamente, a PIV é a combinação de vários processos que vão desde a maturação dos ovócitos, passando pela fecundação, e por fim, o desenvolvimento de embriões viáveis que possam ser transferidos para receptoras.

O Brasil ocupa uma colocação de destaque no cenário internacional de produção de embriões bovinos *in vitro*, sendo responsável por praticamente 67% dos embriões produzidos em 2008. Os últimos relatórios revelam que em 2008 o Brasil produziu cerca de 220.425 embriões bovinos *in vitro*. Esta participação vem crescendo nos últimos anos, pois no ano 2000 o Brasil era responsável por apenas 9% do total de embriões produzidos. (VIANA et al., 2010).

Apesar da grande difusão, a PIV ainda apresenta algumas limitações, como: o baixo rendimento de embriões viáveis produzidos (LONERGAN & FAIR, 2008); baixa resistência aos processos de criopreservação (MAHMOUDZADEH et al., 1994; VAJTA et al., 1996, BALASUBRAMANIAN et al., 1998); e o desvio na proporção sexual dos embriões produzidos nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, com maior proporção de machos nos estágios mais avançados (CARVALHO et al., 1996; PEGORARO et al., 1998).

Dentre as várias etapas da produção de embriões *in vitro* (PIV), a seleção espermática é uma que pode determinar o sucesso da produção de embriões. Essa etapa tem por objetivo separar os espermatozóides viáveis dos não viáveis, crioprotetores, diluentes e agentes infecciosos (HENKEL & SCHILL, 2003). Existem vários métodos de seleção, tais como a migração ascendente (Swim-up), os gradientes de densidade e a lavagem por centrifugação. O gradiente de densidade, conhecido como gradiente de Percoll<sup>®</sup>, é o método mais utilizado na maioria dos laboratórios de reprodução assistida ligados a área animal (CESARI et al., 2006). Porém, efeitos tóxicos do gradiente de Percoll<sup>®</sup> têm sido relacionados com danos ao espermatozóide e ao embrião (DE VOS et al., 1997). Acredita-se que a toxicidade do

Percoll® esteja relacionada a polivinilpirrolidona (PVP) encontrada na sua composição (STREHLER et al., 1998; KATO & NAGAO, 2009).

A utilização do Percoll® na reprodução assistida em humanos é mundialmente proibida (McCANN & CHANTLER, 2000), sendo que, atualmente, seu uso na área animal vem sendo contestado. Desta forma, se faz necessária a realização de experimentos que visem a elaboração de novos protocolos, utilizando outros gradientes de densidade, com resultados que possibilitem suas aplicações nas rotinas de produção de embriões *in vitro* (PIV).

Dentre as alternativas que vem sendo utilizadas estão o Isolate®, que é composto por sílica coloidal; e o Optiprep®, constituído de iodixanol (HARRISON, 1997; CLAASSENS et al., 1998; MENDES et al., 2003; MOUSSET-SIMÉON et al., 2004; RESENDE et al., 2009). O uso do gradiente Isolate®, em sua preparação convencional, tem sido relatado somente em medicina humana. Já o gradiente Optiprep® (d=1.110 a 1.123g/ml), também em preparação convencional, apresentou resultados similares ao gradiente de Percoll® quanto a viabilidade espermática e a produção de embriões bovinos (RESENDE et al., 2009). Protocolos que visem diminuir custos e tempo de preparação podem contribuir trazendo benefícios as rotinas de PIV nos laboratórios.

Este estudo faz parte da Rede de Inovação em Reprodução Animal do Macro programa 1 do Edital Embrapa. Vinculado ao projeto componente: Desenvolvimento de métodos para elevação da qualidade e fertilidade de gametas usados em biotécnicas de reprodução animal assistida.

## **2. Objetivo**

Avaliar possíveis alternativas ao gradiente de Percoll®, para seleção espermática, no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos.

### **2.1 Objetivos específicos**

Determinar os efeitos dos gradientes Percoll®, Optiprep® e Isolate® no (a):

- Qualidade espermática
- Desenvolvimento embrionário
- Proporção sexual dos embriões
- Sobrevivência a criopreservação

**3. Artigo:**

**MINIGRADIENTES ISOLATE E OPTIPREP COMO ALTERNATIVAS AO  
GRADIENTE DE PERCOLL NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**ISOLATE AND OPTIPREP MINIGRADIENTS AS ALTERNATIVES TO PERCOLL  
GRADIENT IN BOVINE *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION**

# MINIGRADIENTES ISOLATE E OPTIPREP COMO ALTERNATIVAS AO GRADIENTE DE PERCOLL NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

## ISOLATE AND OPTIPREP MINIGRADIENTS AS ALTERNATIVES TO PERCOLL GRADIENT IN BOVINE *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION

VIANNA, L.L.<sup>1,2,5</sup>; PRADIEÉ, J.<sup>1,2</sup>; SANTOS, E.C.S.<sup>1,2</sup>; GONÇALVES, A.O.<sup>1,2</sup>; PESSOA, L.V.<sup>2</sup>; MARTINS, C.T.D.C.<sup>2</sup>; VASCONCELOS, M.L.M.<sup>2</sup>; KLAFKE, G.B.<sup>1</sup>; PFEIFER, L.F.M.<sup>1,5</sup>; SCHMITT, E.<sup>1,5</sup>; RHEINGANTZ, M.G.T.<sup>1</sup>; DODE, M.A.<sup>3</sup>; ANGHINONI, L.B.<sup>2</sup>; VIEIRA, A.D.<sup>1</sup>; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.<sup>4</sup>; CORREA, M.N.<sup>1,5</sup>; PEGORARO, L.M.C.<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>5</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPEL.

lizianelv@yahoo.com.br

### Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis alternativas ao gradiente de Percoll®, para seleção espermática, no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: qualidade espermática, desenvolvimento embrionário, viabilidade após a criopreservação e a proporção sexual dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram realizados quatro tratamentos: grupo percoll (90 e 45%) - 4 mL, centrifugado 700xg por 20 min; grupo minipercoll (90 e 45%) - 800 µL, centrifugado a 700xg por 5 min; grupo miniisolate (90 e 45%) - 800 µL, centrifugado a 700xg por 5 min; e grupo minioptiprep (30, 28 e 26%) - 1,2 mL, centrifugado a 900xg por 15 min. A passagem pelos gradientes não afetou as características do sêmen em comparação com a avaliação realizada logo após o descongelamento ( $P > 0,05$ ), sendo somente observada uma diminuição da motilidade total para o grupo minioptiprep ( $P < 0,05$ ). Quanto a produção *in vitro* de embriões, não foi observada diferença na taxa de clivagem entre os grupos percoll e miniisolate ( $P > 0,05$ ), sendo o minipercoll e o minioptiprep inferiores ao percoll ( $P < 0,05$ ) e semelhantes ao miniisolate ( $P > 0,05$ ). No desenvolvimento embrionário, o miniisolate foi superior aos demais grupos em D7 ( $P < 0,05$ ). Em D8, os três minigradientes foram semelhantes ao percoll ( $P > 0,05$ ). Entre os minigradientes, o miniisolate foi superior ao minipercoll e ao minioptiprep ( $P < 0,05$ ). A passagem pelos gradientes não afetou a proporção sexual esperada de 50:50%, além disso, não houve diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Não houve diferença quanto à taxa de sobrevivência a vitrificação nos quatro grupos em 48 h ( $P > 0,05$ ). Concluímos que o miniisolate e o minioptiprep, nas concentrações e volumes estudados neste trabalho, atingiram resultados semelhantes ao percoll. Portanto, são alternativas a utilização do gradiente de Percoll®, na rotina de produção de embriões bovinos *in vitro*.

Palavras Chaves: gradientes de seleção espermática; produção de embrionos bovinos *in vitro*; proporção sexual; qualidade espermática, criopreservação

### Abstract

The objective of this study was to evaluate alternative methods to the gradient of Percoll® for sperm selection used in bovine *in vitro* production systems. We evaluated the following parameters: sperm quality, embryo development, the viability after cryopreservation and sex ratio of bovine embryos produced *in vitro*. Four treatments were performed: percoll group (90 and 45%) – 4 mL, centrifuged at 700xg for 20 min; minipercoll group (90 and 45%) – 800 µL, centrifuged at 700xg for 5 min; miniisolate group (90 and 45%) – 800 µL, centrifuged at 700xg for 5 min; and minioptiprep group (30,28 and 26%) – 1,2 mL, centrifuged at 900xg for 15 min. Different gradients did not affect the semen characteristics compared with the evaluation immediately after thawing ( $P>0,05$ ). It was only observed a decrease in total motility in minioptiprep group ( $P<0,05$ ). The cleavage rates were similar among the percoll and miniisolate groups ( $P>0,05$ ). Minipercoll and minioptiprep groups were lower to percoll ( $P<0,05$ ) and similar to isolate ( $P>0,05$ ). At Day 7 the developmental rates were higher in miniisolate group than other groups ( $P<0,05$ ). But at D8 the developmental rates of minigradients were similar to percoll ( $P>0,05$ ). Among the minigradients, the miniisolate was higher to minipercoll and minioptiprep ( $P<0,05$ ). The treatments did not affect the sex ratio expected of 50:50% ( $P>0,05$ ) and there was no difference among the four groups ( $P>0,05$ ). Also, there was no difference in survival rates after vitrification ( $P>0,05$ ). In conclusion, the miniisolate and the minioptiprep groups, in the concentration and volume used in our experiment, reached similar results to the percoll group. So, they are alternatives to the gradient of Percoll® in the routine of IVP bovine embryos.

Keywords: gradients of sperm selection, *in vitro* bovine embryos production, sex ratio, sperm quality, criopreservação.

## 4. Introdução

Dentre as várias etapas da produção de embriões *in vitro* (PIV), a seleção espermática é uma que pode determinar o sucesso da produção de embriões. Essa etapa tem por objetivo separar os espermatozoides viáveis dos não viáveis, crioprotetores, diluentes e agentes infecciosos (HENKEL & SCHILL, 2003). Existem vários métodos de seleção, tais como a migração ascendente (Swim-up), os gradientes de densidade e a lavagem por centrifugação. O gradiente de densidade conhecido como radiante de Percoll®, é o mais utilizado na maioria dos laboratórios de reprodução assistida ligados a área animal (CESARI et al., 2006). Porém, atualmente, efeitos tóxicos do gradiente de Percoll® têm sido relacionados com danos ao espermatozoide e ao embrião (DE VOS et al., 1997). Acredita-se que a

toxicidade do Percoll® esteja relacionada a polivinilpirrolidona (PVP) encontrada na sua composição (STREHLER et al., 1998; KATO & NAGAO, 2009).

A utilização do Percoll® na reprodução assistida em humanos é mundialmente proibida (McCANN & CHANTLER, 2000), sendo que, atualmente, seu uso na área animal vem sendo contestado. Desta forma, se faz necessário a realização de experimentos que visem a elaboração de novos protocolos, utilizando outros gradientes de densidade, com resultados que possibilitem suas aplicações nas rotinas de produção de embriões *in vitro* (PIV). Além disso, protocolos que diminuam o tempo gasto com a preparação do sêmen e/ou o volume de gradiente utilizado podem trazer ainda maiores benefícios para os laboratórios.

Dentre as alternativas que vem sendo utilizadas estão o Isolate® e o PureSperm®, ambos compostos por sílica coloidal; e o Optiprep®, constituído de iodixanol (HARRISON, 1997; CLAASSENS et al., 1998; MENDES et al., 2003; MOUSSET-SIMÉON et al., 2004; RESENDE et al., 2009).

Baseado nestas considerações, e com o propósito de elaborar diferentes protocolos que possam futuramente substituir a utilização do percoll., o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes gradientes de densidade para seleção espermática na qualidade espermática, no desenvolvimento embrionário, na viabilidade após a criopresevação e na proporção sexual dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Especificamente serão avaliados os gradientes Isolate® e Optiprep®, nas formas de minigradientes, em comparação ao gradiente de Percoll® convencional e na forma de minigradiente.

## **5. Materiais e Métodos**

### **5.1 Meios utilizados**

Os meios de lavagem, maturação, fertilização, lavagem espermática (Sp-TALP), cultivo (SOF) e o Percoll® 90% foram fornecidos pela Nutricell® (Campinas, SP, Brasil). O Isolate® pela Irvine Scientific (Santa Ana, CA, USA) e o Optiprep® pela Sigma (St. Louis, MO, USA).

## **5.2 Coleta, seleção e maturação *in vitro* dos complexos cumulus-oócitos (CCOs)**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Pelotas, RS, Brasil) entre novembro de 2009 a dezembro de 2010. Para este trabalho foram realizadas onze rotinas de PIV.

Ovários de vacas *Bos taurus* foram coletados em abatedouro local, logo após o abate das fêmeas e transportadas até o laboratório em solução salina suplementada com gentamicina à 30°C. Para a obtenção dos complexos cumulus-oócitos (CCO's), folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com o auxílio de uma bomba com pressão de vácuo contínuo. Os ovócitos foram lavados em meio de lavagem, sendo que somente foram selecionados para maturação os CCO's que apresentaram várias camadas de células do cumulus e um citoplasma homogêneo. Os CCO's foram divididos em grupos de 30 – 35 e colocados em poços com 400 µL de meio de maturação cobertos com óleo de silicone e incubados por 22h, a 39°C, 5% CO<sub>2</sub> e umidade saturada.

## **5.3 Seleção espermática**

### **5.3.1 Preparação dos gradientes e tratamentos**

Para o estudo, foram utilizados três gradientes divididos em quatro grupos denominados: grupo percoll e grupo minipercoll, ambos formados por sílica coloidal recoberta por polivinilpirrolidona (Percoll® a 90%); grupo miniisolate, por solução estéril de sílica coloidal estabilizada com ligações covalentes de silano hidrofílico (Isolate® a 90%; e grupo minioptiprep, por iodixanol (Optiprep® a 60%).

No grupo Percoll, foram colocados, em um tubo de poliestireno de 15 mL, primeiramente, 2 mL do Percoll® a 90% e acima 2 mL a 45% e centrifugado. No grupo Minipercoll, em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 400 µL do Percoll® a 90% e 400 µL a 45%. No grupo Miniisolate, em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 400 µL do Isolate® a 90% e 400 µL a 45%. E no Minioptiprep, em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 400 µL do Oproiprep®, nas concentrações de 30, 28 e 26%. Para a obtenção das diferentes concentrações dos gradientes e

formação dos gradientes descontínuos de densidade, estes eram diluídos em meios Sp-TALP. Após a preparação dos gradientes, estes eram estabilizados por uma hora na estufa a 39°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Em todo o experimento foi utilizado sêmen do mesmo ejaculado de um touro da raça Jersey. Próximo ao momento da fecundação o sêmen era descongelado a 30°C por 30 segundos. Eram adicionados 300 µL deste sêmen na superfície de cada gradiente e levados a centrifugação: grupo Percoll a 700xg por 20 min; grupo Minipercoll a 700xg por 5 min; grupo Miniisolate a 700xg por 5 min; e o grupo Minioptiprep a 900xg por 15min.

Ao final da primeira centrifugação, em todos os tratamentos, eram descartados os sobrenadantes e os pellets, contendo os espermatozóides, suspensos em 2 mL (percoll) e 400 µL (minipercoll, miniisolate e minioptiprep) de Sp-TALP e todos levados a uma segunda centrifugação a 700 x g por 5 min. Depois da segunda centrifugação, os novos pellets eram ressuspensos em 40 µL de meio de fecundação.

### **5.3.2 Avaliação espermática**

Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados pelo sistema computadorizado CASA (computer-assisted semen analysis) modelo Ivos-Ultimate 12 (Hamilton Thorne Biosciences, França). As variáveis analisadas nos espermatozóides foram: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos da cauda (BCF) e linearidade (LIN). Dez microlitros de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (Leja standard count, SC20.01.04.B, 20 µM, Leja Product B. V., Holanda) e posteriormente avaliado. Foram selecionados manualmente quatro campos de leitura para análise. O aparelho foi previamente ajustado conforme recomendações do fabricante para avaliação de sêmen bovino.

Para avaliação da integridade da membrana plasmática foi utilizado o diacetato de 6-carboxifluoresceína (FDA) juntamente com o iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probe®, Eugene, Oregon, USA). A amostra de sêmen (10 µL) era misturada a 30 µL da solução de trabalho formada com: 5 µL formol salina (96 mL de solução salina 0,9% e 4 mL de formol 40%); 5 µL de IP (0,75 mM); 10 µL FDA (0,46

mg/mL de DMSO); e 480 µL de citrato de sódio a 3%. Para a avaliação foram contadas 200 células em filtro de comprimento de onda 494/517 nM excitação/emissão, no aumento de 400x sob imersão. As células coradas de verde (FDA) eram consideradas com membrana íntegra, e de vermelho (IP) com membrana lesada.

A integridade de acrossoma foi avaliada com isoticianato de fluoresceína (FITC) conjugado com peanut agglutinin (PNA). Dez microlitros da amostra foram diluídas em 30 µL da solução de trabalho contendo: 5 µL formol salina (96 mL de solução salina 0,9% e 4 mL de formol 40%); 5 µL de IP (0,75 mM); 10 µL FITC – PNA (0,46 mg/mL de PBS); e 480 µL de citrato de sódio a 3%. Foram contadas 200 células, com filtro de comprimento de onda 497/517 nM excitação/emissão, com aumento de 400x sob imersão. Os espermatozoides eram primeiramente avaliados em campo claro e posteriormente na fluorescência. As células visualizadas em campo claro e não visíveis na fluorescência eram considerados vivos com acrossoma íntegro. Quando visualizados na fluorescência eram considerados: vivos com acrossoma reagido (região acrossomal corada de verde, FITC – PNA), mortos com acrossoma íntegro (corados de vermelho, IP) e mortos com acrossoma reagido (corados de vermelho com a região do acrossoma verde, IP/ FITC-PNA).

As avaliações feitas no sêmen foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília, DF, Brasil). Para avaliação da cinética espermática foram realizadas quatro repetições e para integridade de acrossoma e membrana três repetições.

#### **5.4 Fecundação *in vitro***

Decorridas 22-24 h de maturação, os CCO's eram transferidos diretamente para poços contendo 400 µL de meio de fecundação, em grupos de 30 – 35 e divididos aleatoriamente entre os quatro grupos (percoll, minipercoll, miniisolate e minioptiprep). Para estipular a dose inseminante, após os métodos de seleção espermática e avaliação da motilidade, foi avaliada a concentração espermática em câmara de Neubauer sendo utilizado  $1 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL de meio. Após a inseminação, os gametas foram incubados por 18 a 22 horas, à 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada.

## 5.5 Cultivo *in vitro* e avaliação embrionária

O cultivo dos embriões foi feito em meio SOFaa (TAKAHASHI et al., 1992) suplementado com 5% de SFB e cobertos com óleo de silicone, a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, umidade saturada por 8 dias. Considerando o dia da fecundação como dia zero (D0), em D1 os prováveis zigotos foram desnudados através de múltiplas pipetagens, lavados em meio SOFaa e colocados em cultivo em gotas de 400µL, mantendo o número de 30 – 35 estruturas por poço. Avaliação da taxa de clivagem foi realizada a partir da contagem de estruturas que haviam se dividido em D2 sobre o total inseminado. Para o desenvolvimento embrionário, foram considerados viáveis os embriões que estavam em estágio condizente com o dia da avaliação: D7 mórulas compactas e blastocistos e em D8 blastocistos (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1999).

## 5.6 Sexagem dos embriões

A identificação do sexo dos embriões foi feita por PCR (reação em cadeia da polimerase). Foram utilizadas duas seqüências de DNA conhecidas, uma específica para o gene autossômico bovino (primers 1+2) (Invitrogen®, Cleveland, USA), com tamanho de 216 pares de bases e outra para uma região do cromossomo Y (primers 3+4) (Invitrogen®, Cleveland, USA), com tamanho de 175 pares de bases (Ellis & Harpold, 1986). Após a avaliação de desenvolvimento embrionário em D8, os embriões foram lavados em PBS com 0,2% de PVA (polivinilalanina) e armazenados individualmente em microtubos com 20 µL de solução de lise (1% de proteinase K (20 mg/mL), 1% de Tampão 10x para PCR, e 8% de água ultra-pura). Aqueles que ainda apresentavam zona pelúcida foram, primeiramente, colocados em solução de pronase a 0,25% para a degradação da mesma, e depois lavados e armazenados. Para a sexagem, os embriões que já estavam armazenados na solução de lise, foram inicialmente expostos a temperatura de 37°C por 60 min para ocorrer a lise celular e após a 95°C por 15 min para a inativação da proteinase K. O protocolo utilizado para a sexagem foi o descrito por Rheingantz et al. (2006). Os produtos amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Após a eletroforese, o gel era banhado em brometo de etídio e as bandas visualizadas sob luz UV. Quando havia somente uma banda era considerada fêmea,

e duas macho. Além das amostras dos embriões haviam quatro controles: controle negativo (sem DNA, para excluir possível contaminação), de fêmea (contendo DNA de uma fêmea bovina), de macho (contendo DNA de um macho bovino) e o marcador de peso molecular com 100 pares de bases (Ludwig Biotec®, Porto Alegre, RS, Brasil).

## 5.7 Vitriificação dos embriões

Levando em consideração que a qualidade do embrião afeta sua capacidade de sobreviver a criopreservação (NEDAMBALE et al., 2004), blastocistos expandidos dos quatro grupos, avaliados morfológicamente e classificados em excelentes e bons (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1999), foram submetidos à vitriificação. A metodologia utilizada foi descrita por Vajta et al. (1998) em palheta estirada aberta (OPS, oppen pulled straw).

A vitriificação foi efetuada em duas etapas; 1) colocação dos blastocistos na solução de vitriificação 1 (VS1: 1,05 M DMSO, 1,34 Etilenoglicol em TCM 199 adicionado de 20% SFB) por 3 minutos e 2) transferência para a solução de vitriificação 2 (VS2: 2,1 M DMSO, 2,68 M etilenoglicol em TCM adicionado de 20% SFB e 0,3M sacarose) por até 40 segundos, acondicionados nas OPS e imersos em nitrogênio líquido e estocados no botijão. O equilíbrio na solução crioprotetora e o descongelamento foram realizados em placa térmica com temperatura controlada a 39°C. A diluição da solução crioprotetora foi efetuada em concentrações decrescentes de sacarose (0,6 e 0,3M 5 min cada etapa).

A sobrevivência após a vitriificação foi avaliada mediante cultivo *in vitro* em gotas de 100 µL de meio SOFaa condicionado, durante 48 h. Em 24 h foram avaliadas a taxas de re-expansão e em 48 h a taxa de eclosão.

## 5.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, versão 8.0, Cary, NC, USA). O teste de Qui-quadrado foi utilizado para analisar o efeito do grupo sobre a clivagem em D2, o

desenvolvimento embrionário em D7 e D8, a sobrevivência a criopreservação em 24 e 48 h e a proporção sexual entre os grupos e com a esperada de 1:1. E o teste de Tukey para avaliar o efeito dos grupos sobre as características do sêmen.

Para avaliação da taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário foram comparados os resultados do grupo Percoll com os grupos dos minigradientes (Minipercoll, Miniisolate e Minioprep) e entre os minigradientes. As características do sêmen foram comparadas entre os grupos e entre os grupos e a avaliação realizada logo após o descongelamento. A proporção sexual foi comparada com a esperada de 50:50% e entre os grupos, e a sobrevivência mediante a criopreservação entre os grupos.

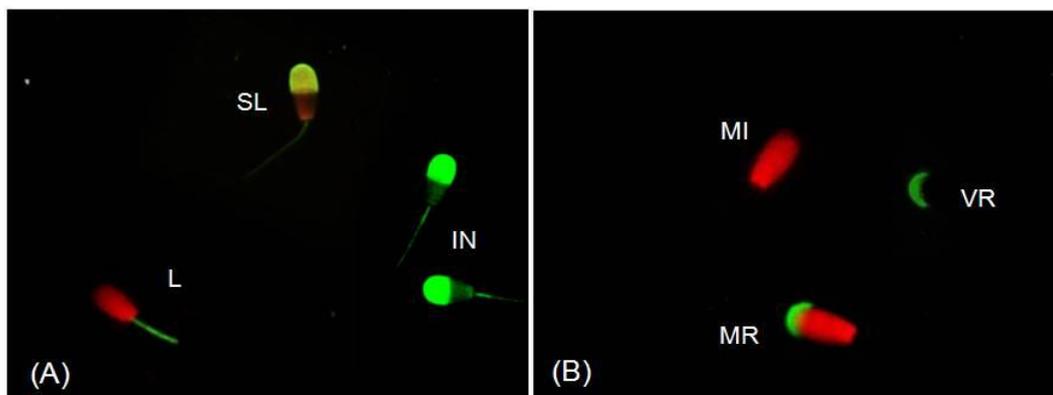
## **6. Resultados**

### **6.1 Avaliação espermática**

Os parâmetros de cinética espermática estão na tab. 1. Para a motilidade total, o Minioprep apresentou resultado inferior ao grupo controle e aos dos demais gradientes ( $P < 0,05$ ). Os grupos Percoll, Minipercoll e Miniisolate foram semelhantes entre si e ao grupo controle para a mesma avaliação ( $P > 0,05$ ). Quanto a motilidade progressiva, o Percoll, o Minipercoll e o Miniisolate foram superiores ( $P < 0,05$ ) ao controle e ao Minioprep ( $P < 0,05$ ). Nas avaliações de velocidade de trajeto (VAP) e velocidade retilínea (VSL), todos os gradientes foram superiores ao controle ( $P < 0,05$ ). Quando comparamos os gradientes, o Miniisolate apresentou resultados superiores aos do Percoll e aos do Minioprep ( $P < 0,05$ ), porém semelhantes aos do Minipercoll ( $P > 0,05$ ). Quanto a velocidade curvilínea (VCL) e frequência de batimentos da cauda (BCF), todos os gradientes testados foram superiores ao controle ( $P < 0,05$ ). Para a amplitude lateral da cabeça (ALH), não houve diferença entre as avaliações realizadas antes e após a passagem pelos gradientes ( $P > 0,05$ ). Porém, o Minioprep foi superior ao Minipercoll ( $P < 0,05$ ). Todos os gradientes foram superiores, para a taxa de linearidade (LIN), ao grupo controle ( $P > 0,05$ ). Entre os gradientes, o Minioprep apresentou taxa de linearidade inferior aos grupos Minipercoll e Miniisolate ( $P < 0,05$ ).

A avaliação da taxa de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro (Fig. 1.B) demonstrou resultados semelhantes entre o grupo controle e a avaliação

realizada após a passagem pelos quatro gradientes de densidade ( $P>0,05$ ) (Tab. 2). Quanto à integridade de membrana (Fig. 1.A), o grupo Minioprep foi inferior aos demais gradientes ( $P<0,05$ ), porém, semelhante ao grupo controle ( $P>0,05$ ) (Tab. 2).



**FIGURA 1** - (A) Integridade de membrana (FDA-IP): membrana lesada (L); membrana semi-lesada (SL); membrana íntegra (IN). (B) Integridade de acrossoma (FITC-PNA): morto com acrossoma reagido (MR); morto com acrossoma íntegro (MI); vivo com acrossoma reagido (VR).

## 6.2 Clivagem e desenvolvimento embrionário

A comparação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário observados nos diferentes grupos estão na tab. 3.

O grupo Miniisolate foi o único minigradiente que apresentou taxa de clivagem semelhante ao Percoll ( $P>0,05$ ), sendo os resultados do Minipercoll e do Minioprep inferiores ( $P<0,05$ ). Porém, quando comparamos a taxa de clivagem somente entre os minigradientes, observamos que o Minipercoll e o Miniisolate apresentaram resultados semelhantes ( $P>0,05$ ), e que ambos foram superiores ao Minioprep ( $P<0,05$ ).

Quanto ao desenvolvimento embrionário, o Miniisolate foi superior ao Percoll em D7 ( $P<0,05$ ), e os demais foram semelhantes ao Percoll ( $P>0,05$ ). No entanto, estes índices não se mantiveram em D8. Neste dia todos os minigradientes apresentaram resultados semelhantes ao Percoll ( $P>0,05$ ). Porém, entre os minigradientes, o Miniisolate foi superior aos demais em D7 e D8 ( $P<0,05$ ), sendo o Minipercoll e o Minioprep semelhantes ( $P>0,05$ ).

Tabela 1 - Cinética espermática antes (controle) e após a passagem pelos gradientes (Média ± EPM).

Grupo	Motilidade total (%)	Motilidade progressiva (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm/s)	BCF (Hz)	LIN (%)
Controle	82.3 ± 5.5 <sup>a</sup>	53.0 ± 5.8 <sup>a</sup>	85.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	68.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	144.5 ± 6.2 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>	20.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	49.0 ± 1.5 <sup>a</sup>
Percoll	87.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	69.5 ± 1.5 <sup>b</sup>	111.6 ± 2.7 <sup>b</sup>	98.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	177.1 ± 5.3 <sup>b</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>ab</sup>	38.9 ± 1.7 <sup>b</sup>	57.3 ± 0.9 <sup>bc</sup>
Minipercoll	87.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	73.0 ± 4.6 <sup>b</sup>	117.6 ± 2.6 <sup>bc</sup>	106.2 ± 2.5 <sup>bc</sup>	177.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	40.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	60.5 ± 1.6 <sup>c</sup>
Miniisolate	92.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	78.8 ± 3.2 <sup>b</sup>	124.8 ± 3.7 <sup>c</sup>	111.9 ± 4.8 <sup>c</sup>	186.2 ± 5.0 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.2 <sup>ab</sup>	41.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	61.5 ± 1.6 <sup>c</sup>
Minioptiprep	70.8 ± 3.1 <sup>b</sup>	51.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	114.0 ± 3.4 <sup>b</sup>	99.9 ± 3.7 <sup>b</sup>	183.4 ± 3.2 <sup>b</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	39.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	54.3 ± 1.5 <sup>b</sup>

Letras iguais na mesma coluna não diferem ( $P>0,05$ ). VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade retilínea; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos da cauda; LIN: linearidade.

**Tabela 2** - Integridade de acrossoma e integridade de membrana antes (controle) e após a passagem pelos gradientes (Média ± EPM).

Grupo	Vivos com acrossoma íntegro (%)	Membrana íntegra (%)
Controle	58.2 ± 5.3 <sup>a</sup>	54.7 ± 5.2 <sup>ab</sup>
Percoll	72.5 ± 5.3 <sup>a</sup>	70.5 ± 7.7 <sup>b</sup>
Minipercoll	65.7 ± 10.1 <sup>a</sup>	72.3 ± 8.8 <sup>b</sup>
Miniisolate	75.7 ± 5.9 <sup>a</sup>	63.8 ± 5.0 <sup>b</sup>
Minioptiprep	49.8 ± 10.3 <sup>a</sup>	39.7 ± 4.3 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ).

**Tabela 3** - Taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário em D7 e D8.

Grupo	Ovócitos	Clivados (%)	Desenvolvimento	
			D7 (%)*	D8 (%)*
Percoll	830	584 (70.4) <sup>a</sup>	159 (19.2) <sup>a</sup>	153 (18.4) <sup>ab</sup>
Minipercoll	897	590 (65.8) <sup>b</sup>	146 (16.3) <sup>a</sup>	145 (16.1) <sup>b</sup>
Miniisolate	648	435 (67.1) <sup>ab</sup>	153 (23.6) <sup>b</sup>	137 (21.1) <sup>a</sup>
Minioptiprep	780	452 (57.9) <sup>c</sup>	147 (18.8) <sup>a</sup>	132 (16.9) <sup>b</sup>

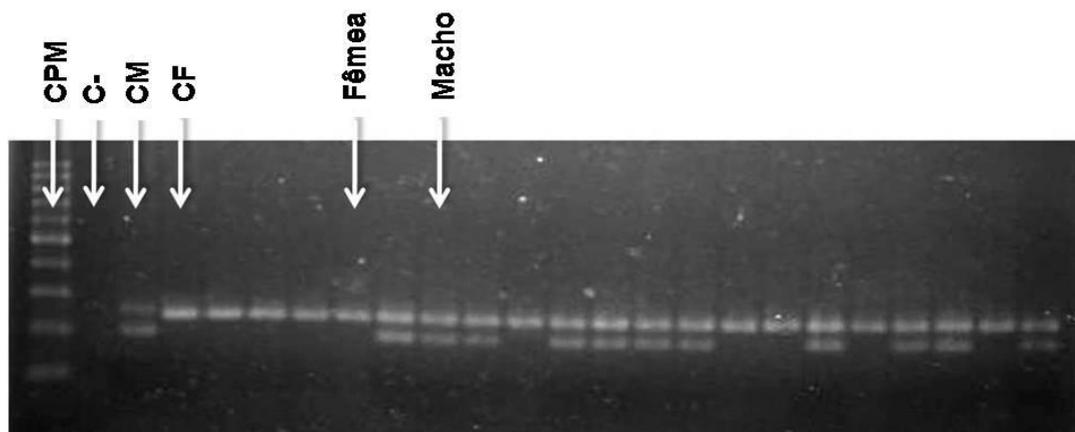
Letras iguais na mesma coluna não diferem ( $P > 0,05$ ).

\*Desenvolvidos / inseminados

### 6.3 Proporção sexual

Dos blastocistos considerados em D8 em cada tratamento, 75% (Percoll), 70% (Minipercoll), 86% (Minioptiprep) e 58% (Miniisolate) foram sexados pela técnica de PCR (Fig. 2).

Comparando a proporção sexual nos diferentes estágios de desenvolvimento e nos embriões degenerados (embriões que não resistiram a vitrificação), encontramos diferença ( $P < 0,05$ ) da proporção esperada de 50% somente nos embriões degenerados do Minisolate ( $P < 0,05$ ). No entanto, quando comparamos o total de embriões com a proporção esperada e entre os tratamentos (Tab. 5) não observamos diferença ( $P > 0,05$ ).



**Figura 2** – Separação dos produtos, amplificados por PCR, em gel de agarose a 2,5%. CPM: controle do peso molecular; C-: controle negativo; CM: controle de macho; CF: controle de fêmea.

**Tabela 4** – Sexo dos embriões produzidos *in vitro*

Grupo	Nº de embriões Sexados	Proporção M:F (%)
Percoll	115	48:67 (42:58) <sup>a</sup>
Minipercoll	102	42:60 (41:59) <sup>a</sup>
Miniisolate	80	30:50 (38:62) <sup>a</sup>
Minioptiprep	114	57:57 (50:50) <sup>a</sup>

\*\* diferente da proporção sexual esperada de 50:50% (P<0,05).

<sup>a,b</sup> diferença encontrada entre os tratamentos (P<0,05).

#### 6.4 Sobrevivência após a vitrificação

Para os resultados de re-expansão, o Minipercoll obteve resultado superior aos demais grupos (P<0,05), que foram semelhantes para esta avaliação (P>0,05) (Tab. 6). Porém quando avaliamos a taxa de eclosão em 48h não houve diferença entre os quatro gradientes (P>0,05) (Tab. 6).

**Tabela 5** – Sobrevivência *in vitro* após a vitrificação de blastocistos expandidos.

Grupo	Embriões Vitrificados	24h n. (%)	48h n. (%)
Percoll	47	34 (72.3) <sup>a</sup>	20 (42.5) <sup>a</sup>
Minipercoll	42	39 (92.8) <sup>b</sup>	22 (52.3) <sup>a</sup>
Miniisolate	37	24 (64.8) <sup>a</sup>	14 (37.8) <sup>a</sup>
Minioptiprep	43	30 (69.7) <sup>a</sup>	17 (39.5) <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna não diferem (P>0,05).

## 7. Discussão

Diferentes autores têm reportado a qualidade dos espermatozoides selecionados pelo Percoll (SAMARDZIJA et al., 2006; ALOMAR et al., 2006). Nos parâmetros de motilidade total e progressiva, Oliveira et al. (2010) e Machado et al. (2009), observaram uma melhora significativa após a utilização do Percoll. O que

também foi observado no nosso trabalho para a motilidade progressiva, não somente para o grupo Percoll, mas igualmente para o Minipercoll e o Minisolate. Acreditamos que não houve diferença na motilidade total dos gradientes para o controle devido à excelente qualidade do sêmen utilizado, o qual apresentava  $82.3 \pm 5.5$  de motilidade total após o descongelamento.

Porém, diferente de Oliveira et al. (2010), que observaram uma diminuição dos valores de VAP, VLS e VCL após a passagem pelo Percoll®, em nosso trabalho observamos um aumento dos três parâmetros nos quatro tratamentos realizados. Similar ao encontrado por McCann & Chantler (2000) quando utilizaram o Percoll® para selecionar células espermáticas de doadores com normozoospermia. Celeghini et al. (2008) acreditam que esta diminuição está relacionada com a presença de grandes partículas que possam ter dificultado a velocidade de trajeto.

Em nosso trabalho observamos que a passagem e o contato com os gradientes não causou reação acrossomal prematura dos espermatozoides, devido aos tratamentos não terem afetado a taxa de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro. Contrariando os dados encontrados por Cesari et al. (2006), que obteve uma diminuição da taxa de células com acrossoma intacto. Oliveira et al. (2010) acreditam que esta divergência de resultados pode ser devido às diferentes concentrações e volumes de gradiente de Percoll® utilizado nos diferentes trabalhos. Porém, acreditamos que esteja mais relacionada a concentração dos gradientes, pois em nosso trabalho, onde comparamos diferentes volumes, Percoll (volume de 4 mL), Minipercoll e Miniisolate (800 µL) e Minioprep (1,2 mL) não observamos diferença. Resultados semelhantes foram encontrados para o teste de integridade de membrana, que, apesar do Minioprep tenha apresentado menor taxa de células com membrana íntegra que os demais gradientes, este não diferiu do controle.

Quanto a produção de embriões, comparando com o Percoll, podemos concluir que a utilização de minigradientes não afetou o desenvolvimento embrionário. Sendo que, o Miniisolate obteve resultados superiores ao grupo Percoll em D7. Acreditamos que esta diferença não se manteve em D8 devido ao grande número de mórulas compactas presentes no Miniisolate em D7, e que por algum motivo não evoluíram até estágios de blastocistos. Porém, quando comparamos somente os minigradientes, observamos resultado superior para o Miniisolate em D7 e D8. Assim como neste estudo, Resende et al. (2009), quando comparam os

gradientes Percoll® e Optiprep®, também não encontraram diferença na produção de embriões entre estes dois gradientes. Sabe-se que tanto o Isolate® e o Percoll® são formados por sílica coloidal, porém no isolate® não há PVP como no Percoll®. Além disso a concentração e o volume utilizado no miniisolate e no minipercoll foram a mesma. Com isso, podemos concluir que a diferença na produção de embriões pode ser devido a toxicidade do PVP presente no Percoll®. (DE VOS et al., 1997; STREHLER et al., 1998; KATO & NAGAO, 2009).

O Miniisolate é um gradiente utilizado nas clínicas de reprodução assistida em humanos, e acreditamos que a sua baixa utilização na linha animal seja devido ao seu elevado valor. Porém a elaboração de protocolos utilizando volumes menores, como no caso deste trabalho, torna acessível a sua utilização.

Segundo Fresh & Gadella (2000) e Celeghini et al. (2008), células que possuem membrana plasmática e acrossoma intactos, além de uma boa função mitocondrial, tem maior capacidade fecundante. Tais observações justificariam a menor taxa de clivagem encontrada no Minioptiprep. Este grupo apresentou menor taxa de células com membrana íntegra que os demais gradientes.

Os espermatozoides X e Y apresentam diferenças no tamanho e no conteúdo de DNA, o que causa diferença no peso e densidade entre eles (PARRILLA et al, 2004), e pode tornar possível a separação destes por gradientes de densidade. Em nosso estudo, os quatro gradientes utilizados mantiveram a proporção de macho e fêmea esperada de 50:50%. Resultado semelhante também foi encontrado por Machado et al. (2009) e Cesari et al. (2003) quando utilizaram o Percoll®. Além disso, estudos mostram diferença na proporção sexual nos diferentes estágios de desenvolvimento. Tendo as fêmeas desenvolvimento mais lento que os machos (RHEINGANTZ et al., 2006). Porém, em nosso trabalho esta diferença não foi encontrada.

A resistência à criopreservação (vitrificação) foi utilizada com um parâmetro para avaliação da qualidade embrionária, onde se sabe que embriões de melhor qualidade resistem melhor a este processo (NEDAMBALE et al., 2004). Observamos que apesar do Minipercoll ter obtido maior taxa de re-expansão que os demais tratamentos, todos foram semelhantes na taxa de eclosão. Ainda concordando com este autor, encontramos no Miniisolate uma maior proporção de fêmeas ( $P < 0,05$ ), no grupo de embriões degenerados, ou seja, aqueles que não

resistiram a criopreservação. Mantendo assim a idéia de que embriões deste são mais sensíveis a criopreservação.

## 8. Conclusões

Concluimos que a utilização de minigradientes não afetou os parâmetros estudados em comparação ao grupo Percoll. E que o Miniisolate e o Minioprep, nas concentrações e volumes testados neste trabalho, podem ser possíveis substitutos para o Percoll® nos laboratórios de reprodução animal, dando ênfase para o Miniisolate que apresentou os melhores resultados entre os minigradientes. Além disso, para aqueles que utilizam o gradiente de Percoll®, o minigradiente a 700xg é mais uma alternativa.

## Referências

ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, L. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development *in vitro*. **Reproduction Fertility Development**, v.18, p.395-402, 2006.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J.; LEIBO, S.P. Effect on development of chilling *in vitro*-produced bovine embryos at various cleavage stages. **Theriogenology**, v.49, p.162, 1998.

CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PALASZ, A.T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R.J. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. **Theriogenology**, v. 45, p. 489-498, 1996.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

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

CLAASSENS, O.E.; MENKVELD, R.; HARRISON, K.L. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. **Human Reproduction**, v.13, n.11, p.3139-3143, 1998.

DE VOS, A.; NAGY, Z.P.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; BOCKEN, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.12, p.1980-1984, 1997.

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

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the processo of fertilization. **Biochimica at Biophysica Acta**, v.1469:197-235, 2000.

HARRISON, K.. Iodixanol as a Density Gradient Medium for the Isolation of Motile Spermatozoa. **Jornal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.14, n.7, p.385-387, 1997.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.1, p.1-108, 2003.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and emrbyonic development in cattle. **Theriogenology**, v.72, p.624-635, 2009.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.M.. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio od bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-1297, 2009.

McCANN, C.T.; CHANTLER, E.. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrossome reaction. **International Journal os Andrology**, v.23, p.205-209, 2000.

MENDES Jr, J.O.B.; BURNS, P.D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL Jr, G.E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v.60, p.331-340, 2003.

MOUSSET-SIMÉON, N.; RIVES, N.; MASSE, L.; CHEVALLIER, F.; MACE, B. Comparison of six density gradient media for selection of criopreserved donor spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.881-884, 2004.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; YANG, X.Y.; TIAN, X.C. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1671-1676, 2004.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.V.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted sêmen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, aceito em maio de 2010.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of x- and y-chromosome-bearing goat spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.54, p.93-108, 2004.

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.581-587, 2009.

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. The sex ratio the *in vitro* produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation. **Animal Reproduction**, v.3, n.4, p.423-430, 2006.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.237-247, 2006.

STREHLER, E.; BACCETTI, B.; STERZIK, K.; CAPITANI, S.; COLLDEL, G.; SANTOS, M.; GAMBERA, L.; PIOMBONI, P. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.120-123, 1998.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.. **Manual Internacional de Transferência de Embriões**, 3.ed., 1999, 180p.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L.. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.29-32, 1992.

VATJA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. & CALLESEN, H. Factors affecting survival of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.191-200, 1996.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

### Referências gerais

ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, L. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development *in vitro*. **Reproduction Fertility Development**, v.18, p.395-402, 2006.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J.; LEIBO, S.P. Effect on development of chilling *in vitro*-produced bovine embryos at various cleavage stages. **Theriogenology**, v.49, p.162, 1998.

CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PALASZ, A.T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R.J. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. **Theriogenology**, v. 45, p. 489-498, 1996.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

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

CLAASSENS, O.E.; MENKVELD, R.; HARRISON, K.L. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. **Human Reproduction**, v.13, n.11, p.3139-3143, 1998.

DE VOS, A.; NAGY, Z.P.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; BOCKEN, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.12, p.1980-1984, 1997.

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

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the processo of fertilization. **Biochimica at Biophysica Acta**, v.1469:197-235, 2000.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

HARRISON, K.. Iodixanol as a Density Gradient Medium for the Isolation of Motile Spermatozoa. **Jornal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.14, n.7, p.385-387, 1997.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.1, p.1-108, 2003.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and emrbyonic development in cattle. **Theriogenology**, v.72, p.624-635, 2009.

LONERGAN, P; FAIR, T. In-vitro produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.M.. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-1297, 2009.

McCANN, C.T.; CHANTLER, E.. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v.23, p.205-209, 2000.

MAHMOUDZADEH, A.R.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T. ; DE KRUIF, A. Comparison of two step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.42, p.1389-1397, 1994.

MENDES Jr, J.O.B.; BURNS, P.D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL Jr, G.E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v.60, p.331-340, 2003.

MOUSSET-SIMÉON, N.; RIVES, N.; MASSE, L.; CHEVALLIER, F.; MACE, B. Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.881-884, 2004.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; YANG, X.Y.; TIAN, X.C. Bovine blastocyst development *in vitro*: timing, sex, and viability following vitrification. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1671-1676, 2004.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.V.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, aceito em maio de 2010.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of x- and y-chromosome-bearing goat spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.54, p.93-108, 2004.

PEGORARO, L. M. C.; THUARD, J. M.; DELALLEAU, N.; GUERIN, B.; DESCHAMPS, J. C.; MARQUANT-LE-GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or vero cells. **Theriogenology**, v.49, p.1579-90, 1998.

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.581-587, 2009.

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. The sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation. **Animal Reproduction**, v.3, n.4, p.423-430, 2006.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.237-247, 2006.

STREHLER, E.; BACCETTI, B.; STERZIK, K.; CAPITANI, S.; COLLDEL, G.; SANTOS, M.; GAMBERA, L.; PIOMBONI, P. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.120-123, 1998.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.. **Manual Internacional de Transferência de Embriões**, 3.ed., 1999, 180p.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L.. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.29-32, 1992.

VATJA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. & CALLESEN, H. Factors affecting survival of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.191-200, 1996.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

VIANNA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P., CAMARGO, S.A. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae: XXIV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. Porto Alegre:UFRGS, p.661-674, 2010.