

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**PREPARAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE COMO FONTE DE
VARIAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Alexander de Oliveira Gonçalves

Pelotas, 2013

Alexander de Oliveira Gonçalves

**PREPARAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE COMO FONTE DE VARIAÇÃO 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: Ivan Bianchi

Co-Orientadores: Arnaldo Diniz Vieira

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ivan Bianchi, UFPEL

Prof. Dra. Mari Lourdes Bernardi, UFRGS

Prof. Dr. Augusto Schneider, UFPEL

Prof. Dr. Gabriel Ribas Pereira, UFPEL

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a duas pessoas fundamentais em minha vida, meus pais Manoel e Jussara, pois sem o apoio e o esforço deles eu não haveria de chegar a lugar algum, agradecer pelo carinho, amor e confiança e por sempre estarem dispostos a me ajudar em qualquer situação.

Agradecer a toda a minha família pelo carinho e apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador Ivan Bianchi pela dedicação e confiança prestados a mim durante esse período. Aos meus co-orientadores Arnaldo Vieira, Lígia Pegoraro e Rafael Mondadori pela paciência, pelo grande aprendizado e pela persistência em tentar fazer com que sempre eu buscasse o meu melhor. A todos os demais professores, pós-graduandos e estagiários do grupo de pesquisa ReproPel pelo auxílio e principalmente pela amizade demonstrada, pois sem estes eu não haveria de chegar ao final desta trajetória.

A todos os funcionários e estagiários da Embrapa Clima Temperado que sempre me apoiaram e auxiliaram em meus experimentos e também em minhas “aventuras” (treinamentos) na parte de campo.

É um agradecimento especial a minha namorada Karina que sempre esteve ao meu lado, sendo fundamental por seu amor, carinho, companheirismo, amizade e paciência, me incentivando a não desistir e sempre lutar por meus ideais e objetivos.

Ao programa de Pós Graduação em Veterinária e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradecer a todos que me ajudaram direta ou indiretamente a chegar ao final desta caminhada.

Lista de Tabelas

TABELA 1: Taxas de motilidade e recuperação espermática pós-seleção espermática observadas nos tratamentos de congelamento com Glicerol (GLI) ou Etilenoglicol (EG) e nos grupos de seleção espermática com Mini Percoll (MP) ou Mini OptiPrep (MO).19

TABELA 2: Taxas de integridade de membrana (IM), de acrossoma (IA) e funcionalidade de membrana (FM) observadas nos tratamentos antes e após a seleção nos diferentes gradientes.....20

TABELA 3: Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário no D7 e no D8 para os tratamentos Glicerol/Percoll (GLI/MP), Glicerol/OptiPrep (GLI/MO), Etilenoglicol/Percoll (EG/MP) e Etilenoglicol/OptiPrep (EG/MO).....21

Lista de Abreviaturas

CCOs: Complexos cumulus-oócito

CIV: Cultivo *in vitro*

EG: Etilenoglicol

FIV: Fecundação *in vitro*

GLI: Glicerol

MIV: Maturação *in vitro*

N₂L: Nitrogênio Líquido

OP: OptiPrep

MO: Mini OptiPrep

MP: Mini Percoll

PIV: Produção *in vitro* de embriões

SEE: Soro de égua em estro

Sumário

1. Introdução geral.....	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos específicos	10
2.3. Hipóteses	10
3. Artigo	11
4. Resumo.....	11
5. Abstract	12
6. Introdução	13
7. Materiais e Métodos.....	15
7.1. Obtenção e congelamento do sêmen.....	15
7.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	15
7.2.1. Preparação dos gradientes.....	15
7.2.2. Seleção espermática	16
7.2.3. Avaliações espermáticas	17
7.3. Análise Estatística.....	17
8. Resultados	18
9. Discussão.....	21
10. Conclusão	23
11. Referências Bibliográficas	24

1. Introdução geral

A PIV de embriões bovinos é a biotécnica de reprodução assistida que apresentou o maior crescimento nas últimas décadas. Sua evolução permitiu o estabelecimento de uma extensa cadeia produtiva que colocou o Brasil como maior produtor mundial de embriões PIV da atualidade (Stroud et al., 2011). Entretanto, apesar do aumento na produção total de embriões, a qualidade dos embriões PIV ainda é inferior a dos embriões produzidos *in vivo* em termos de criotolerância e taxa de prenhez. Esta diferença na qualidade é atribuída em parte a qualidade do ovócito (Khurana et al., 2000) e em parte a falta de adequação dos meios utilizados no CIV (Camargo et al., 2006), não sendo dado muito ênfase a influência do espermatozoide sobre a qualidade do embrião obtido na PIV. Portanto, existe necessidade de estudar/avaliar aspectos como crioprotetores e métodos de seleção espermática sobre o desenvolvimento do embrião, já que o simples uso de espermatozoides congelados determina maior taxa de morte embrionária (Moraes et al., 1998). Testando um possível efeito individual, verificou-se que a taxa de produção de embriões PIV sofre influência do macho (Palma & Sinowitz, 2004), entretanto, quando do uso de um mesmo macho não foi observado influência do tipo de diluente usado no congelamento do sêmen (Coelho et al., 2000). Porém, quando são utilizados crioprotetores diferentes podem ser observadas diferenças na integridade dos espermatozoides. Quando do uso do GLI e EG observou-se que as taxas de motilidade são maiores nas amostras congeladas com GLI (Awad, 2011), entretanto, os resultados de integridade estrutural do espermatozoide são superiores com a utilização do EG em ovinos (Moraes et al., 1998) e em bubalinos (Swelum et al., 2011). Estes resultados sinalizam a necessidade de determinar o quanto a preservação da integridade estrutural do espermatozoide pode influenciar na taxa de desenvolvimento e qualidade dos embriões PIV.

Além das manipulações para a criopreservação, os espermatozoides utilizados na FIV passam por um processo de seleção potencialmente capaz de gerar danos estruturais, assim sendo, é necessário determinar o impacto de diferentes meios de seleção espermática. Deste modo, a realização da FIV com espermatozoides com maior integridade de acrossoma e membrana citoplasmática pode favorecer uma maior taxa de fecundação. Previamente a FIV são realizados

procedimentos para seleção espermática que eliminam o diluente e o crioprotetor utilizados no congelamento, além de células e espermatozoides mortos, visando à seleção apenas os espermatozoides com maior motilidade. Dentre os diferentes métodos de seleção, um dos mais difundidos baseia-se na centrifugação em gradientes de sílica recoberta de polivinil-pirrolidona (Percoll[®]) devido à alta taxa de recuperação espermática em relação ao método de seleção por migração ascendente - *swim-up* (Cesari et al., 2006). Entretanto, em função de terem sido detectadas toxinas no Percoll[®] em níveis superiores aos toleráveis para uso em humanos, tem-se buscado alternativas para substituir este tipo de gradiente por outros mais seguros. Dentre os potenciais substitutos podem ser citados: Bovipure[®], Isolate[®], PureSperm[®] e OptiPrep[®] (Samardzija, 2006; Claassens, 1998). O iodixanol (OptiPrep[®]) tem se mostrado promissor pelo fato de ser uma molécula não iônica atóxica para espermatozoides e embriões (Harrison, 1997) que tem como vantagem a baixa influência na determinação da proporção sexual dos embriões PIV (Resende et al., 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Determinar a influência dos crioprotetores GLI e EG e dos métodos de seleção espermática Percoll[®] e OptiPrep[®] na forma de mini gradientes sobre a integridade de espermatozoides utilizados na PIV verificando sua influência sobre a taxa de produção dos embriões.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do GLI e EG nas características espermáticas pós-descongelamento;
- Avaliar o efeito do GLI e EG na taxa de PIV de embriões bovinos;
- Avaliar o efeito da seleção espermática por mini gradientes de Percoll[®] e OptiPrep[®] na taxa de PIV de embriões bovinos;
- Correlacionar análises espermáticas *in vitro* com as taxas de PIV de embriões.

2.3. Hipóteses

- O congelamento com EG proporciona melhor proteção ao espermatozoide durante o processo de criopreservação;
- O método de seleção MO proporciona melhores resultados de PIV de embriões bovinos;
- Existe uma correlação entre o crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen e o método de seleção espermática.

3. Artigo

PREPARAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE COMO FONTE DE VARIAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

SPERM PREPARATION AS A SOURCE OF VARIATION *IN VITRO* BOVINE EMBRYO

Gonçalves, A.O.¹; Cardoso, T.F.¹; Pradieé, J.¹; Madeira, E.M.¹; Santos, E.S.¹; Lazzari, J.C.²; Mondadori, R.G.¹; Pegoraro, L.M.C.²; Lucia Jr, T¹, Bianchi, I¹, Vieira, A.D.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal - ReproPel - Universidade Federal de Pelotas - UFPel

²Laboratório de Reprodução Animal - Embrapa Clima Temperado

4. Resumo

A PIV de embriões bovinos é a biotécnica de reprodução assistida que apresentou o maior crescimento nas últimas décadas, entretanto, vários fatores podem concorrer no comprometimento dos resultados. Este trabalho objetivou determinar a influência do crioprotetor e do gradiente de seleção espermática sobre a recuperação e integridade dos espermatozoides e a taxa de PIV de embriões bovinos. Inicialmente, um ejaculado de um touro reconhecidamente eficiente na FIV foi dividido em duas frações, uma delas congelada com 5% de glicerol (GLI) e a outra com 3% de etilenoglicol (EG). No momento da seleção espermática, cada grupo foi centrifugado a 5000 x g/5min em mini gradientes descontínuos de Percoll[®] (MP; 90 e 45%) ou OptiPrep[®] (MO; 30 e 26%) usando o método de volume reduzido (600µl), constituindo quatro grupos experimentais: GLI/MP; EG/MP; GLI/OP e EG/OP. Foram realizadas avaliações espermáticas pré e pós seleção espermática de motilidade, aglutinação, recuperação, integridade de membrana (IM), integridade de acrossoma (IA) e funcionalidade mitocondrial (FM). Com relação à produção embrionária, foram avaliados os parâmetros de clivagem, desenvolvimento embrionário no dia 7 (D7) e no dia 8 (D8). Na avaliação espermática ao descongelamento as taxas de motilidade observadas foram semelhantes ($P>0,05$) entre os grupos GLI ($78,6 \pm 6,9$) e EG ($75,7 \pm 5,3$). Nesse momento também não foi detectada aglutinação espermática nas amostras dos dois tratamentos. Pós-seleção espermática foi encontrada diferenças para motilidade e recuperação espermática entre os grupos, GLI/MP; EG/MP e GLI/OP; EG/OP ($82,9 \pm 7,6$ e $46,5 \pm 13,8$; $81,4 \pm 9,0$ e $44,3 \pm 16,3$ vs. $27,1 \pm 4,9$ e $23,1 \pm 7,4$; $31,4 \pm 6,9$ e $29,8 \pm 12,4$, respectivamente). Não foram encontradas diferenças nas avaliações de integridade estrutural dos espermatozoides pós-descongelamento e pós-seleção espermática em nenhum dos grupos testados ($P>0,05$). Nas avaliações de produção embrionária os grupos GLI/MP e EG/MP foram superiores ($P<0,05$) para clivagem do que os grupos GLI/OP e EG/OP ($66,1 \pm 8,1$ e $60,6 \pm 14,2$ vs. $41,6 \pm 7,9$ e $48,5 \pm 7,5$, respectivamente). No D7, as taxas de produção de blastocistos obtidas no grupo GLI/MP foram maiores ($P<0,05$) do que no GLI/MO, mas foram semelhantes ($P>0,05$) ao EG/MP, que por sua vez, não diferiu ($P>0,05$) do EG/MO. Neste momento, apenas o EG/MO não diferiu ($P>0,05$)

do GLI/MO. No D8, os grupos EG/MP, EG/MO e GLI/MO foram semelhantes ($P>0,05$). Conclui-se que o crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen não interfere em nenhuma das avaliações espermáticas e de desenvolvimento embrionário e que o método de seleção espermática usando o mini gradiente OptiPrep® afeta a motilidade e recuperação espermática proporcionando menor taxa de produção embrionária do que quando se utiliza o mini gradiente Percoll®.

Palavras chave: Crioprotetor, fecundação, seleção espermática.

5. Abstract

The bovine in vitro embryo production (IVEP) showed a great expansion in last decades, but, various factors concurs to low embryo production rates. This paper aimed to determine the influence of cryoprotector and sperm selection gradient on super recuperation rate and sperm integrity, including the rate of IVEP. The ejaculate of a bull with high FIV rates was divided; one part was frozen with 5% glycerol (GLY) and the other with 3% of ethylene glycol (EG). At sperm selection each group was centrifuged at 5000 x g/5min in discontinuous Percoll® (MP; 90 e 45%) and OptiPrep® (MO; 30 e 26%) mini gradients (600µl), forming four experimental groups: GLI/MP; EG/MP; GLI/OP e EG/OP. Motility, agglutination, recuperation rate, membrane integrity (MI), acrosome integrity (AI) and mitochondrial activity (MA) were evaluated pre- and post-sperm selection. Embryo production rates were accessed at cleavage, D7 and D8. At thawing there was no difference ($P>0,05$) on sperm motility (GLY - $78.6\% \pm 6,9$ and EG - $75.7\% \pm 5,3$) and no sperm agglutination was detected. After sperm selection motility and sperm recuperation were different ($P<0,05$) between the groups GLY/MP; EG/MP e GLY/OP; EG/OP (82.9 ± 7.6 e 46.5 ± 13.8 ; $81.4 \pm 9,0$ and 44.3 ± 16.3 vs. 27.1 ± 4.9 e 23.1 ± 7.4 ; $31,4 \pm 6.9$ e 29.8 ± 12.4 , respectively). On the other hand, there were no difference ($P>0,05$) between groups in sperm structural integrity after thawing and after sperm selection. The cleavage rate of GLY/MP and EG/MP groups were higher ($P<0,05$) than GLY/OP and EG/OP (66.1 ± 8.1 e 60.6 ± 14.2 vs. 41.6 ± 7.9 e 48.5 ± 7.5 , respectively). At D7 blastocyst rates of GLY/MP group was superior ($P<0,05$) than GLY/MO, but similar ($P>0,05$) to EG/MP group, which do not differ ($P>0,05$) from EG/MO. At this moment only EG/MO do not differ ($P>0,05$) from GLY/MO. EG/MP, EG/MO and GLY/MO groups presented similar ($P>0,05$) embryo production rates at D8. In conclusion, the cryoprotectant do not interfere in the evaluated sperm and embryo parameters, and Percoll® mini-gradient provided better embryo production rates than OptiPrep® mini-gradient.

Key Words: Cryoprotector, fertilization, sperm selection.

6. Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia bastante difundida na espécie bovina, entretanto, a eficiência ainda se encontra em valores médios de 30-40% de desenvolvimento embrionário, refletindo a importância dos danos gerados pela manipulação dos gametas e embriões (Camargo, 2006). Esta é a biotécnica de reprodução assistida que apresentou o maior crescimento nas últimas décadas. Sua evolução permitiu o estabelecimento de uma extensa cadeia produtiva que colocou o Brasil como maior produtor mundial de embriões PIV da atualidade (Stroud et al., 2011).

As taxas de desenvolvimento embrionário podem ser influenciadas por diferentes fatores dentro de cada uma das etapas da PIV. Na fecundação *in vitro* (FIV), o macho utilizado pode influenciar significativamente nos resultados (Coelho, 1998; Al Naib, 2011; Palma et al., 2004). Entretanto, existem suspeitas de que os processos de manipulação dos espermatozoides possam influenciar em sua capacidade de realizar a fecundação e/ou o posterior desenvolvimento embrionário *in vitro* (Rosenkranz et al., 1997). Durante o processo de criopreservação, o uso de diferentes diluentes não afetou a taxa de PIV de embriões bovinos (Coelho et al., 2000). Entretanto, como o uso de diferentes crioprotetores pode influenciar a motilidade (Awad et al., 2011) e a integridade de membrana e acrossoma dos espermatozoides (Brisola et al., 1999; Swelum et al., 2011), existe possibilidade que a PIV possa ser influenciada pelo aumento da viabilidade dos espermatozoides utilizados. Usualmente isso já é buscado com a prática de submeter o sêmen a um processo de seleção para eliminar células defeituosas, componentes do diluente de congelamento e boa parte dos agentes contaminantes. Porém, os diferentes procedimentos de preparação podem influenciar nas taxas de recuperação espermática, bem como determinar diferentes níveis de agressão aos espermatozoides. Porém alguns estudos relatam não existir correlação entre algumas das avaliações espermáticas *in vitro* e o potencial fertilizante destes espermatozoides (Tangue et al., 2002; Tartaglione et al., 2004).

A seleção dos espermatozoides para FIV pode ser feita mediante diferentes processos, tais como: diluição e concentração (lavagem), filtração em lã de vidro, migração ascendente (*Swim-up*) ou centrifugação em gradientes contínuos ou descontínuos (Coelho et al., 2000). Devido à taxa de recuperação espermática, a

seleção por centrifugação em gradiente de Percoll[®] constitui um dos procedimentos de uso mais difundido (Cesari et al., 2006). Entretanto, como o Percoll[®] é um produto a base de sílica coloidal recoberta de polivinil-pirrolidona (PVP) identificou-se níveis de toxinas inaceitáveis para uso na FIV em humanos (McCANN et al., 2000), bem como, observou-se desvio significativo na proporção sexual dos embriões (Resende et al., 2010). Esta situação determinou a necessidade de busca por outros produtos de maior segurança e menor influência na proporção sexual dos embriões. Atualmente, produtos como o Pure-Sperm[®], Isolate[®], Bovipure[®] e OptiPrep[®] estão disponíveis para uso na FIV em bovinos, entretanto, informações de comparação de eficiência entre os gradientes ainda são limitadas. Dentre os gradientes pesquisados, o OptiPrep[®] tem se mostrado promissor por ser composto por uma molécula não iônica atóxica para espermatozoides e embriões (Harrison, 1997) e não determinar tanto desvio na proporção sexual dos embriões quanto o Percoll[®] (Resende et al., 2009). Contudo, não existem informações sobre um potencial efeito aditivo do emprego de diferentes crioprotetores e processos de seleção espermática sobre as taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo correlacionar a influência do glicerol ou etilenoglicol e da seleção espermática com Percoll ou OptiPrep sobre a integridade estrutural do espermatozoide e seu impacto sobre as taxas de PIV de embriões bovinos.

7. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com o Comitê de ética no uso de animais, quando necessário. Exceto onde indicado, todos os meios utilizados foram confeccionados com produtos Sigma e água ultra-pura (Milli-Q).

7.1. Obtenção e congelamento do sêmen

Como doador de sêmen foi utilizado um touro da raça Flamenga (Epagri-SC), reconhecidamente eficiente na PIV de embriões. O sêmen foi coletado com vagina artificial, sendo avaliado quanto motilidade e vigor espermáticos logo após a coleta. O ejaculado foi dividido em duas frações e diluído em meio lactose gema (Foote et al., 1960). Cada fração recebeu 5% de GLI ou 3% de EG, de acordo com o tratamento. Nos dois tratamentos, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL, com 60×10^6 espermatozoides/ml e submetido à refrigeração a $0,3^\circ\text{C}/\text{min}$. Após 2 horas de estabilização a 5°C , as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido a 4 cm acima do nível (Graham, 1996) por 10 min e em seguida mergulhadas no líquido no qual permaneceram armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso.

7.2. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

A PIV foi realizada segundo Vieira et al. (2006), com procedimentos modificados pelo uso de meios comerciais (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e a realização do processo de seleção espermática através do uso de gradientes em mini volumes (Machado et al., 2009).

7.2.1. Preparação dos gradientes

O Percoll[®] (100%) foi inicialmente diluído na proporção de 9:1 em Sperm-TALP (Parrish et al., 1995) concentrado 10x para obtenção de uma solução de trabalho a 90%. Com no mínimo 2 horas de antecedência do momento de início do processo de seleção, a solução de trabalho foi diluída 1:1 em Sperm-TALP constituindo a fração 45%. Para constituição do gradiente descontínuo de Percoll[®] em mini-volume (MP) foi utilizado um tubo cônico de 1,5mL contendo 300 μl da fração 90% sob 300 μl da fração 45%.

O Optiprep[®] (60%) foi inicialmente diluído na proporção de 2:1 em Sperm-TALP para obtenção de uma solução de trabalho a 40%, de acordo com a recomendação (Axis, 2010). Para preparação dos gradientes foi utilizado solução de trabalho 3:1 e 2,6:1,4 em Sperm-TALP para obtenção das soluções de 30 e 26%, respectivamente (Axis, 2010). O gradiente descontínuo de Optiprep[®] em mini-volume (MO) foi confeccionado da mesma forma do que no grupo MP, empregando 300µl de solução a 30% sob 300µl de solução 26%.

Logo após a preparação, os tubos com os mini-gradientes dos dois grupos foram mantidos em estufa a temperatura de 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ para estabilização de temperatura.

7.2.2. Seleção espermática

Imediatamente ao final do processo de maturação *in vitro* (MIV) uma palheta de sêmen congelado com cada um dos crioprotetores foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 s. Após a deposição e homogeneização do sêmen em tubos cônicos mantidos aquecidos, foram coletadas amostras para avaliação da viabilidade espermática pré-seleção em cada tratamento. Em seguida, amostras de 100µL de sêmen de cada tratamento foram depositadas sobre os gradientes MP e MO. Os quatro tubos contendo os grupos de tratamento GLI/MP, GLI/MO, EG/MP e EG/MO foram submetidos à centrifugação inicial a 5000xg por 5 min (Machado et al., 2009). Após isso, procedeu-se a remoção de 600µl do sobrenadante e resuspensão do *pellet* de espermatozoides com 400µl de Sperm-TALP. A seguir, procedeu-se nova centrifugação a 5000xg por 3min e descarte de 400µl do sobrenadante. Os espermatozoides selecionados presentes no *pellet* formado na base dos 100µl remanescentes foi resuspenso e dividido em uma amostra para determinação da viabilidade espermática pós-seleção e outra para inseminação dos ovócitos maturados *in vitro*. A FIV (dia zero = D0) em todos os grupos de tratamento foi realizada com uma dose inseminante ajustada em 1×10^6 células por mL de meio. No D1 procedeu-se o desnudamento dos prováveis zigotos mediante pipetagens sucessivas, seguido da transferência para o meio de cultivo *in vitro* (CIV). Os dados das taxas de clivagem e de desenvolvimento de blastocistos foram coletados no D2; D7 e D8, respectivamente.

7.2.3. Avaliações espermáticas

Com auxílio de microscópio óptico (E200, Nikon, Japão), antes e após o processo de seleção espermática foram determinados os parâmetros de motilidade e vigor, além da concentração espermática usando platina aquecida a 37°C e câmara de Neubauer, respectivamente. Adicionalmente, determinou-se a taxa de adesão entre espermatozoides selecionados mediante a atribuição de um escore de aglutinação espermática: 0 (sem aglutinação); 1 (aglutinação leve); 2 (aglutinação moderada) e 3 (aglutinação intensa).

Usando microscópio de epifluorescência (Olympus, BX51, America inc., São Paulo, SP) foram empregados os fluorocromos iodeto de propídio e o Diacetato de Carboxifluoresceína para identificar a integridade de membrana espermática (Harrison & Vickers, 1990); a clortetraciclina associada a *Lectin from Arachis hypogaea-FITC Conjugate* para identificar as células com acrossomo lesado (Kawamoto et al., 1999) e a Rhodamine 123 para identificar a funcionalidade mitocondrial (Evenson et al., 1982). Para cada avaliação foram contados 200 espermatozoides por lâmina, considerando a intensidade de fluorescência e/ou coloração decorrente da acumulação de cada fluorocromo.

7.3. Análise Estatística

Foi realizada a estatística descritiva dos dados e posterior teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as variáveis dependentes paramétricas foi realizada análise de variância testando as possíveis interações e posterior comparação de médias através do teste LSD (*Least Significant Difference*). Para os dados não paramétricos foi realizada análise através do Kruskal-Wallis e posterior comparação de médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistix 9[®] (2008).

8. Resultados

Na avaliação espermática ao descongelamento as taxas de motilidade observadas foram semelhantes ($P>0,05$) entre os grupos GLI ($78,6\pm 6,9$) e EG ($75,7\pm 5,3$). Nesse momento também não foi detectada aglutinação espermática nas amostras dos dois tratamentos. Entretanto, na avaliação após a seleção espermática foi observada diferença ($P<0,05$) nas taxas de motilidade e recuperação espermática nos grupos MP e MO (Tabela1). Nos grupos de tratamento GLI/MP e EG/MP foram observadas taxas de aglutinação espermática de $1,57\pm 0,5$ e $1,71\pm 0,5$, respectivamente, enquanto que nos grupos de tratamento GLI/MO e EG/MO não houve aglutinação espermática.

Tabela1: Taxas de motilidade e recuperação espermática pós-seleção espermática observadas nos tratamentos de congelamento com Glicerol (GLI) ou Etilenoglicol (EG) e nos grupos de seleção espermática com Mini Percol (MP) ou Mini OptiPrep (MO)

Crioprotetor	Gradiente	Motilidade (%)	Recuperação espermática(%)
GLI	MP	$82,9 \pm 7,6^a$	$46,5 \pm 13,8^a$
	OP	$27,1 \pm 4,9^b$	$23,1 \pm 7,4^b$
EG	MP	$81,4 \pm 9,0^a$	$44,3 \pm 16,3^a$
	OP	$31,4 \pm 6,9^b$	$29,8 \pm 12,4^b$

^{ab} Expoentes distintos na mesma coluna diferem $P<0,05$

As taxas de integridade de membrana, acrossoma e funcionalidade mitocondrial, observadas foram semelhantes ($P>0,05$) ao descongelamento e após a seleção (Tabela 2) nos tratamentos GLI e EG e grupos MP e MO, respectivamente.

Tabela 2: Taxas de integridade de membrana (IM), de acrossoma (IA) e funcionalidade mitocondrial (FM) observadas nos tratamentos antes e após a seleção nos diferentes gradientes

Crioprotetor	Gradiente	IM (%)	IA (%)	FM (%)
GLI	PS	78,6 ± 18,4	37,3 ± 25,8	40,0 ± 26,2
	MP	85,4 ± 11,5	43,0 ± 28,2	51,8 ± 29,8
	MO	73,7 ± 27,1	40,8 ± 22,7	36,7 ± 32,1
EG	PS	73,7 ± 27,0	54,6 ± 30,3	40,5 ± 35,5
	MP	67,8 ± 19,6	52,7 ± 19,2	38,9 ± 34,6
	MO	41,7 ± 32,8	44,8 ± 21,7	40,2 ± 38,4

GLI = Glicerol; EG = Etilenoglicol; PS = Pré-Seleção; MP = Mini Percoll e MO = Mini OptiPrep

As taxas de clivagem (D2) foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento GLI/MP e EG/MP, que foram maiores ($P > 0,001$) do que no GLI/MO e EG/MO, os quais não diferiram entre si ($P > 0,05$) (Tabela 3). No D7, as taxas de produção de blastocistos obtidas no grupo GLI/MP foram maiores ($P < 0,05$) que GLI/MO, mas foram semelhantes ($P > 0,05$) ao EG/MP, que por sua vez não diferiu do EG/MO ($P > 0,05$). Neste momento, apenas o EG/MO não diferiu ($P > 0,05$) do GLI/MO (Tabela 3). No D8, os grupos EG/MP, EG/MO e GLI/MO foram semelhantes ($P > 0,05$).

Tabela 3: Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário no D7 e no D8 para os tratamentos Glicerol/Percoll (GLI/MP), Glicerol/OptiPrep (GLI/MO), Etilenoglicol/Percoll (EG/MP) e Etilenoglicol/OptiPrep (EG/MO)

Tratamento	Ovócitos (n)	Clivagem (%)	Desenvolvimento embrionário	
			D7 (%)	D8 (%)
GLI/MP	300	66,1 ± 8,1 ^a	29,3 ± 9,6 ^a	31,5 ± 15,1 ^a
GLI/MO	313	41,6 ± 7,9 ^b	8,6 ± 8,0 ^c	14,1 ± 9,5 ^b
EG/MP	300	60,6 ± 14,2 ^a	23,8 ± 10,6 ^{ab}	27,4 ± 11,2 ^{ab}
EG/MO	304	48,5 ± 7,5 ^b	14,7 ± 10,3 ^{bc}	18,1 ± 13,6 ^{ab}

^{abc} Expoentes distintos na mesma coluna diferem P<0,05

9. Discussão

Não foi encontrada influência do crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen sobre os parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelamento. Foram observadas apenas diferenças quanto ao método de seleção espermática, sendo que o método MP proporcionou melhores resultados para motilidade e recuperação espermática, resultando em melhores resultados de taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário na maioria dos grupos em que foi utilizado do que quando se utilizou o método MO.

Awad (2011) propôs que a utilização do crioprotetor EG poderia trazer benefícios para os espermatozoides no congelamento quando comparado ao GLI, por este ter um maior peso molecular. Porém seus resultados mostraram que a motilidade espermática foi superior no grupo GLI quando comparado ao grupo EG (72,4% vs. 56,9%, respectivamente). Brisola et al. (1999), na espécie ovina, testaram os mesmos crioprotetores obtendo resultados semelhantes quanto à integridade de acrossoma, porém obtiveram resultados diferentes entre os crioprotetores na avaliação de integridade de membrana, sendo o crioprotetor EG superior na proteção desta estrutura.

Foi observado que o crioprotetor utilizado não interferiu em nenhuma das avaliações *in vitro* de IM, IA e FM. Este fato também não ocorreu em nenhum dos quatro tratamentos após a seleção espermática, mesmo sendo observados resultados diferentes para a motilidade espermática após este processo. Segundo Tanghe et al. (2002) as avaliações de motilidade e morfologia estão diretamente relacionadas com resultados de fertilidade *in vitro*, porém, não foi observada esta mesma relação para as avaliações de integridade de membrana, atividade mitocondrial e integridade de acrossoma. Já Classens et al. (1998) testaram a utilização do método OptiPrep[®] em substituição ao Percoll[®], observando melhores resultados para motilidade espermática no método Percoll.

Outro ponto importante é que o gradiente de seleção MO não proporcionou taxa de aglutinação, isto pode ser explicado pela baixa motilidade pós este processo. Já o método MP apresentou taxa de aglutinação, mesmo com uma possível melhor qualidade espermática determinada pela avaliação de motilidade progressiva.

Quanto à taxa de clivagem, o método de seleção MP foi superior ao método MO, independente do crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen. A possível diferença entre estes resultados pode ser explicada pela superioridade do método MP quanto à motilidade e taxa de recuperação pós-seleção espermática, já que o método de seleção não influenciou em nenhuma outra avaliação espermática. Resende et al. (2009) testaram os mesmos métodos de seleção espermática demonstrando resultados semelhantes quanto à clivagem e desenvolvimento embrionário.

Na produção embrionária foi encontrada uma interação entre os crioprotetores e o método de seleção no D7 e também no D8, porém com resultados diferentes. Mesmo os grupos GLI/MP e EG/MP apresentando resultados superiores para clivagem, no D7 o grupo EG/MP não diferiu do grupo EG/MO. Este foi inferior ao GLI/MP, porém semelhante ao grupo GLI/MO. A maior diferença foi encontrada entre os grupos GLI/MP e GLI/MO demonstrando que o método de seleção espermática influencia no número de embriões obtidos no D7.

Já no D8, observou-se uma dispersão entre os grupos GLI/MP e GLI/MO demonstrado novamente apenas influência no método de seleção, porém quando o crioprotetor utilizado foi o EG não foi encontrada esta mesma variação.

Outro fator importante é que neste estudo foram utilizados os mini gradientes em volume ainda mais reduzido que os demais estudos, 600µl ao invés de 800µl. Vianna (2012) testou a utilização do Percoll[®] em volume de 4ml, em mini gradiente com 800µl e o OptiPrep[®] com três gradientes com volume total de 1200µl não observando diferença na produção embrionária.

10. Conclusão

O crioprotetor utilizado no congelamento de sêmen não influenciou em nenhuma das avaliações espermáticas testadas, bem como nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário.

As avaliações espermáticas *in vitro* de IM, IA e FM não foram capazes de prever a habilidade fecundante dos espermatozoides.

O método de seleção MP é mais eficiente na manutenção da motilidade, apresentando um maior percentual de recuperação espermática, repercutindo em maior clivagem e conseqüentemente melhores resultados de produção embrionária.

11.Referências Bibliográficas

1. AL NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v.76, p.161-167, 2011.
2. AXIS Application Sheet C01: 5th edition, February 2010
3. AWAD, M.M. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.123, p.157–162, 2011.
4. BRISOLA, L. B. de S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P, B, D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MONTAGNER, M.M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 527-531, 1999.
5. CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factores influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.19-28, 2006.
6. CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, 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.
7. CLAASSENS, O.E.; MENKVELD, R.; HARRISON, K.L. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. **Hum Reprod**. v.13, n.11, p.3139-3143, 1998.
8. COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr., I.L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 120-122, 1998.
9. COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; JUNIOR, I.L.A.; Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p. 397-402, 2000.
- 10.EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.30, p. 279-280, 1982.

- 11.FOOTE, R.H.; GRAY, L.C.; YOUNG, D.C.; DUNN, H.O. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. **J. Dairy Sci.** v.43, p.1330-1337, 1960.
- 12.GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North Am Equine Pract.** v.12, n.1, p.131-47, 1996.
- 13.HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- 14.HARRISON, K. Iodixanol as a density gradient medium for the isolation of motile spermatozoa. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics.** v.14, n.7, p.385-387, 1997.
- 15.KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA,Y. Two-color fluorescent staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 497- 501, 1999.
- 16.KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology.** v.54, p. 741-756, 2000.
- 17.MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. 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.
- 18.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.
- 19.MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural.** v.28, n.2, p.287-292, 1998.
- 20.PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and Female Effects on the In Vitro Production of Bovine Embryos. *Anat. Histol. Embryol.* v. 33, p.257–262, 2004.

21. PARRISH, J.J.; A KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L.; Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v.44, p. 859–870, 1995.
22. 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.
23. RESENDE, M.V.; LÚCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; LIMA, V.F.M.H. Desvio na proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.11, n.1, p.260-269, 2010.
24. ROSENKRANZ, Ch.; HOLZMANN, A. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine *in vitro* fertilization. **Animal Reproduction Science**. v.46, p.47-53, 1997.
25. SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; GETZ, I.; MAKEK, Z.; CERGOLJ, M.; DOBRANIC, T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reprod Biol Endocrinol**, v.4, n.58, p.1-7, 2006.
26. STROUD, B.; BO, G.A. Estatísticas Mundiais de 2009 para Transferência Embrionária em Animais Domésticos de Fazenda. Resumo do Relatório da Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**, 2011.
27. STATISTIX® 9. **Analytical Software. User's manual**. 396 p. Tallahassee. FL. 2008.
28. SWELUM, A.A.; MANSOUR, H.A.; ELSAYED, A.A.; AMER, H.A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. **Theriogenology**. Article in press, 2011.
29. TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reprod. Dom. Anim.** v.37, p.127-132, 2002.

30. TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. v,62, p.1245-1252, 2004.
31. VIANNA, L.L.; PRADIEÉ, J.; SANTOS, E.C.S.; GONÇALVES, A.O.; PFEIFER, L.F.M.; DODE, M.A.N.; VIEIRA, A.D.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; CORRÊA, M.N.; PEGORARO, L.M.C. Developmental rates of IVP bovine embryos using minigradient of Percoll[®] Isolate[®] and OptiPrep[®]. **International Congress on Animal Reproduction (ICAR)**, 2012.
32. VIEIRA, A.D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L. Bovine *in vitro* embryo production protocol: does it really influence embryo cryotolerance? **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, n.1, p.57-63, 2006.