

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CENTRIFUGAÇÃO COM AMORTECIMENTO DURANTE A SELEÇÃO
ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CECILIA ISABEL INÊS URQUIZA MACHADO PAVIN

Uruguaiiana, RS, Brasil
2016

CECILIA ISABEL INÊS URQUIZA MACHADO PAVIN

**CENTRIFUGAÇÃO COM AMORTECIMENTO DURANTE A SELEÇÃO
ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniela dos Santos Brum

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiana

2016

CECILIA ISABEL INÊS URQUIZA MACHADO PAVIN

**CENTRIFUGAÇÃO COM AMORTECIMENTO DURANTE A SELEÇÃO
ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia da Reprodução.

Dissertação defendida e aprovada em 05 de agosto de 2016.

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Daniela dos Santos Brum
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Antônio Mondino Silva
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Dr. Gilson Antonio Pessoa
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Dedico esta conquista a um anjinho que em breve estará entre nós, e por quem já tenho amor incondicional, o Gonçalo. Que com certeza será mais um motivo para buscarmos ser sempre melhores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos permite desfrutar de tudo que nos foi dado, nos tornando cada dia mais forte para seguirmos a diante e acreditar em um amanhã cada vez melhor.

Ao meu marido Leonardo, que me acompanha desde a minha escolha pela profissão, e que soube compreender a minha ausência, sendo capaz de incentivar-me todos os dias, para que eu não desanimasse, me fazendo ver o lado bom das coisas e assim, alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, João e Isabel, que serão meus eternos professores. O que sou hoje devo a vocês, que muito se empenharam para que seus filhos fossem pessoas dignas. Em especial agradeço meu pai, que não mediu esforços para conseguirmos o material necessário para a pesquisa, me levando todas as semanas aos frigoríficos da região. Ao meu irmão Joaquim, que apesar das brigas está, e estará, sempre me apoiando.

A nossa grande família (meus pais e irmão, meu marido, a toda família Pavin e agregados) agradeço por estarem ao meu lado, independente da circunstância, me apoiando e incentivando, pelo amor e carinho, e por serem o meu porto seguro, minha base. Obrigada por acreditarem que eu chegaria até aqui e por estarem ao meu lado em cada novo desafio.

Aos meus mestres, prof^a Daniela Brum, e prof. Fabio Leivas, que me ensinaram mais que conhecimentos teóricos, me ensinaram lições para a vida, me tornando não apenas uma profissional melhor, mas também uma pessoa mais forte e confiante. Agradeço por acreditaram em mim, e me darem a oportunidade de crescer e querer ir mais além; obrigada não apenas pelos ensinamentos, mas pela amizade construída. Sem me esquecer do Martin, que me “acompanha” desde o início desta nova etapa.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, BIOTECH, o meu muito obrigada. Foram muitas as pessoas que cruzaram meu caminho durante os cinco anos no laboratório, com vocês eu aprendi muito, e tenho certeza que levarei um pouquinho de cada um, e espero ter deixado um pouquinho de mim. Sem citar nomes, agradeço especialmente aos que estiveram ao meu lado durante os dois anos de mestrado, incluindo aqui, o pessoal da Bioquímica e a Prof^a Francielli.

Aos colegas e mestres do PPGCA, muito obrigada, vocês sem dúvida são parte importante desta conquista.

A UNIPAMPA, ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e estrutura para realizar mais esta etapa de minha vida. Aos colaboradores: Alta Genetics e Frigorífico Marfrig os quais disponibilizaram os materiais para os experimentos. Sem eles não seria possível à realização do mesmo.

Enfim, a vocês: família, mestres e colegas, os quais posso chamar de amigos, muito obrigada; vocês foram, e são essenciais para esta conquista!

*(...) Tudo pode ser, se quiser será
O sonho sempre vem pra quem sonhar
Tudo pode ser, só basta acreditar
Tudo que tiver que ser, será*

*Tudo que eu fizer
Eu vou tentar melhor do que já fiz
Esteja o meu destino onde estiver
Eu vou buscar a sorte e ser feliz (...)*

Lua de Cristal – Michael Sullivan

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Pampa

CENTRIFUGAÇÃO COM AMORTECIMENTO DURANTE A SELEÇÃO ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

AUTOR: Cecilia Isabel Inês Urquiza Machado Pavin

ORIENTADORA: Daniela dos Santos Brum

Uruguaiana-RS, 05 de agosto de 2016.

Os métodos de seleção espermática são utilizados com o objetivo de isolar uma maior população de espermatozoides morfológicamente melhor, além de permitir a capacitação destes, incrementando a taxa de embriões produzidos *in vitro*. Entre os métodos de seleção, o mais utilizado comercialmente na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é o método de Gradiente Descontínuo de Percoll® (GDP). No entanto, apesar da praticidade desta técnica, a etapa de centrifugação é prejudicial, sendo responsável por danos estruturais as células espermáticas, bem como a diminuição da motilidade e da taxa de recuperação, interferindo assim, nas taxas de fecundação *in vitro* (FIV). Este estudo objetivou avaliar a centrifugação com amortecimento utilizando uma solução de iodixanol durante a seleção espermática para a PIV de embriões bovinos. No experimento I, o sêmen foi descongelado e dividido em quatro grupos, e os espermatozoides submetidos a separação espermática pelo método de GDP com ou sem a solução colóide; sendo o amortecimento testado na primeira (C1), segunda (C2) ou ambas centrifugações (C1-2). Em seguida, foram avaliadas a taxa de recuperação, a cinética espermática, e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No experimento II foi avaliada a taxa de fecundação e a cinética de desenvolvimento embrionário dos grupos C e C1, que foram os tratamentos que demonstraram os melhores resultados para a cinética espermática, taxa de recuperação e análise bioquímica no primeiro experimento. Neste estudo, o grupo com amortecimento obteve um aumento na taxa de fecundação e clivagem, quando comparado ao grupo controle (60,5 vs 48,55 e 80,0 vs 64,7%, respectivamente). Com base nestes resultados foi possível concluir que o uso de

uma solução de amortecimento durante a etapa de centrifugação para a seleção espermática permitiu a preservação da cinética e da integridade da membrana dos espermatozoides, sem reduzir a taxa de recuperação. Adicionalmente, foi demonstrado pela primeira vez que o uso da centrifugação com amortecimento incrementa, não apenas a taxa de fecundação e clivagem, mas também o número de embriões que clivam mais cedo.

PALAVRAS CHAVES: sêmen, bovino, PIV, seleção espermática, gradiente descontínuo de Percoll®.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

USE OF A CUSHIONING CENTRIFUGATION DURING SPERM SELECTION FOR *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

AUTHOR: Cecilia Isabel Inês Urquiza Machado Pavin

ADVISOR: Daniela dos Santos Brum

Uruguaiana, August 05, 2016.

In order to optimize bovine *in vitro* fertilization (IVF), sperm selection methods have been used to isolate sperm subpopulations with high fertilizing capacity for use in animal breeding. Among the methods of sperm selection, the most common method used is the Discontinuous Percoll® Gradients (DPG). However, again despite the practicality of this technique, the centrifugation step is harmful, accounting for structural damage in sperm and decrease in motility and sperm recovery rate, as well as interfering with *in vitro* fertilization rates. This study aimed to evaluate the cushioned centrifugation using an iodixanol solution on sperm selection for *in vitro* production (IVP) of bovine embryos. In experiment I, the thawed semen was divided into four groups and the sperm subjected to the separation method by discontinuous Percoll® gradients with and without a colloid solution, where the cushioning was tested in the first (C1), second (C2), and both centrifugations (C1-2). Then, the recovery rate, sperm kinetics, and production of reactive oxygen species (ROS) were evaluated. Experiment II evaluated the fertilization rate and embryonic development kinetics of C and C1 groups; who were the treatments that have shown the best results for motion kinetics, recovery rate, and biochemical analysis in Experiment I. In this assay, the group with cushioning obtained an increase in the fertilization and cleavage rate when compared with the control (60.5 vs 48.55 and 80.0 vs 64.7%, respectively). With this study, we can conclude that the use of a cushion solution during centrifugation on sperm selection had preserved the motion properties of spermatozoa and the

integrity of the sperm membrane without lowering the recovery rate. Furthermore, it was demonstrated for the first time that the use of cushioned centrifugation increases not only the cleavage rate but the number of embryos previously cleaved.

KEYWORDS: semen, bovine, IVP, sperm selection, discontinuous Percoll® gradients.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo

Figure 1: Production of reactive oxygen species (ROS) by sperm after the sperm selection, without (C) or with the CushionFluid® in the first (C1), second (C2) or both centrifugations (C1-2).....	50
--	----

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1: Sperm kinetics (mean \pm SD) by Sperm Class Analyzes (SCA) after sperm selection without (C) or with the cushion solution in the first (C1), second (C2), or both centrifugations (C1-2).	49
Table 2: Total fertilization rate, normal fertilization, penetration, and cleavage from selected bovine sperm Discontinuous Percoll® Gradient method without (C) or with (C1) the iodixanol density solution.....	51
Table 3: Embryonic development (D7) of the cleaved embryos from sperm selection by Discontinuous Percoll® Gradients method without (C) or with the addition of CushionFluid® (C1).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

Anova – Análise de variância

BCF - Frequência de batimento flagelar cruzado

BSA – Albumina sérica bovina

Ca²⁺ - Ion Cálcio

CCO – Complexo *cumulus* oócito

CFDA – Diacetato de carboxi fluoresceína

CIV – Cultivo *in vitro*

CO₂ – Dióxido de carbono

COCs - Cumulus oocyte complexes

DCF – 2'7' Diclorofluoresceína

DCHF-DA - 2'7' Diclorofluoresceína Diacetato

DPG – Discontinuous Percoll® Gradients

EO – Estresse oxidativo

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GDP – Gradiente descontínuo de Percoll®

hEGF – Fator de crescimento epidermal humano

hpi – Horas após a inseminação

IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

IVC – *In vitro* culture

IVF – *In vitro* fertilization

IVM – *In vitro* maturation

IVP – *In vitro* production

LH – Hormônio luteinizante

LIN - Linearidade

MIV – Maturação *in vitro*

MOT – Motilidade

OPU – *Ovum Pick Up*

PBS - Solução Salina Fosfatada

PHE – Penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PI – Iodeto de propídio

PIV – Produção *in vitro*

PM – Motilidade progressiva

PVP – Polivinilpirrolidona

RA – Reação acrossômica

ROS – Reactive oxygen species

SCA – Sperm Class Analyzer

SD – Desvio padrão

SOFaaci – Fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos, citrato e mioinositol

STR - Retilinearidade

Talp-Fert - Solução de Tyrode's, acrescida de albumina, lactato e piruvato

TCM 119 – Meio de cultivo celular 199

UF – Unidades de fluorescência

VAP - Velocidade média da trajetória

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade linear progressiva

WOW – Well of the well

ZP – Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	21
2.2. Fecundação <i>in vitro</i>	22
2.2.1. Seleção Espermática.....	24
2.2.1.1. Gradiente Descontínuo de Percoll®.....	24
2.2.1.2. Efeito da centrifugação nas células espermáticas.....	27
2.2.2. Sistema de amortecimento.....	28
2.2.2.1. Solução de Iodixanol.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos:.....	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
Abstract	34
1. Introduction	35
2. Materials and Methods	36
2.1. Experimental design.....	36
2.2. Oocyte recovery and <i>in vitro</i> maturation (IVM)	37
2.3. Sperm selection procedures.....	37
2.4. <i>In vitro</i> fertilization (IVF)	38
2.5. <i>In vitro</i> culture (IVC)	38
2.6. Assessment of sperm quality parameters	38
2.7. Kinetics of embryonic development.....	40
2.8. Statistical analysis	41
3. Results	41
3.1. Experiment 1	41
3.2. Experiment 2	42
4. Discussion	42
5. Conclusions	45
6. Acknowledgments	45

7. References	46
5. CONCLUSÕES.....	53
6. PERSPECTIVAS	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE A	62
APÊNDICE B	65
ANEXO.....	67

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma biotecnologia da reprodução que vem sendo amplamente incorporada nos programas de melhoramento animal. Um significativo aumento mundialmente foi descrito nos últimos anos; com um recorde histórico em 2013, onde 42% dos embriões produzidos foram originados da fecundação *in vitro* (FIV; Blondin, 2015). Em 2013, pela primeira vez, a produção global de embriões bovinos PIV, ultrapassou meio milhão, com 546.628 de embriões produzidos, onde 94,68% dos oócitos foram obtidos pelo método de *Ovum Pick-Up* (OPU) e 5,31% por colheita dos ovários nos abatedouros. Este aumento é consideravelmente significativo quando comparado a 2012, o que indica o crescente desenvolvimento de novas tecnologias e a melhora na eficiência na produção de embriões oriundos da fecundação *in vitro* (Perry, 2014). A PIV de embriões está em constante crescimento, tendo uma alta demanda na América do Sul, particularmente no Brasil, onde em 2010 foi responsável por mais de 60% dos embriões produzidos (Viana *et al.*, 2010); e em 2013 produziu 70,8% dos embriões bovinos OPU—FIV do mundo (Perry, 2014).

Embora a PIV possa ser considerada em grande parte uma técnica já estabelecida, muitas das suas etapas ainda estão em desenvolvimento e necessitam de mais estudos para aperfeiçoamento e obtenção de melhores resultados. Diversos fatores podem comprometer os resultados deste processo, entre eles a preparação espermática para a FIV. Diferentes métodos vêm sendo propostos para a seleção de espermatozoides destinados a FIV, sendo possível selecionar uma população espermática que possua um maior número de células móveis e morfológicamente normais, além de remover componentes do diluente, plasma seminal, debris celulares e agentes infecciosos, de forma rápida, fácil e de baixo custo (Henkel e Schill, 2003); sendo esta seleção fundamental para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante (Rodríguez-Martínez, 2003).

Dentre os métodos de seleção espermática, o método de gradiente descontínuo de Percoll® é o mais utilizado comercialmente em laboratórios de PIV de embriões bovinos (Cesari *et al.*, 2006). O Percoll® é uma sílica coloidal estabilizada em sódio, com 15 a 30nm de diâmetro, recobertas com polivinilpirrolidona (PVP) sendo esta responsável por proteger as células da ação tóxica da sílica (Pertoft, 2000). A metodologia desta técnica de separação espermática consiste na formação de gradiente descontínuo de Percoll®, sendo a densidade

aumentada da camada inferior para a superior, e a amostra de sêmen depositada sobre o gradiente, para posterior centrifugação e obtenção de um *pellet* contendo os espermatozoides selecionados. Protocolos de Mini Percoll com volumes reduzidos, atualmente estão sendo empregados com sucesso na FIV para sêmen sexado ou convencional (Machado *et al.*, 2009; Folchini *et al.*, 2012). Modificações no gradiente, força e tempo de centrifugação também foram empregados, tornando o procedimento mais rápido e eficiente. Entretanto, apesar desta praticidade, a etapa de centrifugação presente na técnica do Percoll® é prejudicial, sendo responsável por danos estruturais nos espermatozoides, queda da motilidade e taxa de recuperação espermática, interferindo nas taxas de fecundação *in vitro* (Sieme *et al.*, 2003; Matás *et al.*, 2007).

Guimarães e colaboradores (2014) demonstraram que uma menor força de centrifugação aumenta a taxa de penetração e fecundação espermática *in vitro* de sêmen bovino, quando comparada a uma força comercialmente utilizada. Os danos são ainda mais expressivos quando os protocolos são aplicados ao sêmen sexado, onde apenas um terço dos espermatozoides submetidos ao processo de sexagem por citometria de fluxo permanecem viáveis para utilização (Garner e Seidel Jr, 2003), pois este apresenta espermatozoides que já sofreram alguns danos durante a sexagem, tais como a diluição, exposição a corante de DNA, luz ultravioleta, altas pressões, entre outros processos de separação celular o que altera a viabilidade das células espermáticas (Garner, 2006). Sendo assim, modificações são necessárias nos protocolos de seleção espermática, visando minimizar os danos às células.

Com o objetivo de reduzir os danos aos espermatozoides e aumentar a recuperação espermática, Alvarez e colaboradores (1993) propuseram uma técnica de centrifugação com amortecimento previamente ao congelamento de sêmen humano. A centrifugação com amortecimento foi realizada utilizando uma solução colóide, o iodixanol, que possui uma densidade maior que a do sêmen, dessa forma os espermatozoides foram recuperados sobre esta camada, impedindo a aderência e impacto do *pellet* formado ao tubo (Stuhtmann *et al.*, 2012). A eficiência do método de amortecimento na proteção das células espermáticas durante a centrifugação também foi demonstrada em suínos (Matás *et al.*, 2007) e equinos (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005; Len *et al.*, 2013). No entanto, apesar desta técnica já ter sido utilizada em diferentes espécies, trabalhos aplicando a centrifugação com amortecimento para a seleção de espermatozoides bovinos para a PIV de embriões são inexistentes, sendo assim, o objetivo do

trabalho foi avaliar a capacidade protetora do iodixanol, durante a seleção espermática pelo método de mini Percoll® modificado, com sêmen bovino convencional destinado a PIV de embriões.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIV é uma biotécnica da reprodução assistida que se refere à combinação de vários processos interdependentes: obtenção e maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, fecundação *in vitro* (FIV), e o cultivo *in vitro* (CIV) com o desenvolvimento embrionário até a fase de implantação.

A maturação do oócito é uma condição essencial para que ocorra a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (Dieleman *et al.*, 2002). Fisiologicamente este processo inicia com a liberação do hormônio luteinizante (LH) durante o ciclo estral, de forma a reiniciar a meiose; *in vitro* este processo inicia com a retirada do *Complexo-Cumulus-Oócito* (CCO) do contato com as células foliculares e líquido folicular, que possuem substâncias inibitórias à maturação (Sirard, 2001). Para que a maturação seja completa, deve ocorrer a maturação nuclear, com a segregação cromossômica, e a maturação citoplasmática, com a reorganização das organelas, armazenamento de RNAm e modificações nos padrões de fosforilação das proteínas (Landim-Alvarenga e Maziero, 2014). Para isto, é fundamental a realização da maturação adequadamente, pois quando se avalia a influência da MIV no processo de PIV de embriões, nota-se que apesar da maturação nuclear de oócitos bovinos *in vitro* comumente chegar a 80-90% (Lonergan *et al.*, 2003), somente 30 à 40% destes desenvolvem-se até o estágio de blastocisto.

A segunda etapa da PIV é a FIV, que depende, além da qualidade do oócito, da procedência do sêmen a ser utilizado (Hansen, 2006). Esta etapa envolve uma complexa sequência de eventos, onde destacamos a seleção e capacitação espermática, de forma a permitir a ligação e penetração dos espermatozoides à zona pelúcida (ZP), com consequente fusão dos pronúcleos, feminino e masculino, e então, a divisão celular (Silva, 1998). Dando início a terceira e última fase da PIV, o CIV, que compreende um período de seis a nove dias, onde os prováveis zigotos são transferidos a um meio de cultivo, para então ocorrer à clivagem, ativação do genoma e desenvolvimento embrionário, até o estágio de blastocistos. Nesta fase deve-se atentar para a suplementação do meio (proteínas, lipídeos, hormônios, entre outros) e assim como nas demais etapas, manter as condições atmosféricas favoráveis.

Embora a PIV possa ser considerada em grande parte um método já estabelecido, muitos dos seus aspectos ainda estão em desenvolvimento e necessitam de mais estudos para sua total compreensão e melhor aproveitamento da técnica. Diversos fatores comprometem os resultados deste processo, entre eles a preparação espermática para a FIV.

2.2. Fecundação *in vitro*

A fecundação é o processo que resulta na união do oócito com o espermatozoide, marcando o início da transição do oócito a embrião. Para o sucesso da FIV é fundamental uma correta preparação de ambos os gametas, onde o oócito deve estar maturado adequadamente e o espermatozoide ser selecionado e capacitado (Gordon, 2003).

Sob condições *in vivo*, milhões de espermatozoides são liberados no trato reprodutivo feminino e iniciam seu caminho até o local da fecundação, onde apenas um espermatozoide irá fecundar o oócito. Este processo é responsável pela eliminação dos espermatozoides imaturos ou danificados, e permite que as células espermáticas passem por mudanças fisiológicas, ocorrendo à chamada capacitação, que concede a competência funcional do espermatozoide (Henkel e Schill, 2003; Suarez, 2007).

A capacitação é o processo pelo qual o espermatozoide obtém potencial fecundante e consiste na reorganização de proteínas e lipídios da membrana plasmática, alterações nas características de motilidade e mudanças na atividade metabólica que culminam com a reação acrossômica (RA), permitindo a liberação de enzimas que irão possibilitar a penetração do espermatozoide no oócito (Gonçalves *et al.*, 2008). Após a penetração ocorre a fusão entre o espermatozoide e o oócito, sendo o gameta masculino incorporado pelo ooplasma. Com esta fusão a carga genética é restabelecida, e o oócito é ativado, levando a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações de Ca^{2+} intracelular, entre outros fatores que irão permitir o reinício da meiose, e conseqüentemente a formação do zigoto e início da clivagem (Gordon, 2003).

Diversos fatores estão relacionados e contribuem para o sucesso da interação entre o oócito previamente maturado e os espermatozoides na FIV de bovinos. Entre os fatores destacamos a influência do touro sobre as taxas de fecundação, e os meios de cultura, com a necessidade, ou não, de suplementação destes. Ward e colaboradores (2001) demonstraram que o

reprodutor interfere na cinética de desenvolvimento embrionário inicial, apresentando significativa variação no momento da primeira clivagem, e conseqüentemente na produção de embriões mais “precoces”. A influência do touro já foi demonstrada em trabalhos anteriores (Lobo *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2015), podendo esta variação da fertilidade ser ajustada pela dose inseminante (Inaba *et al.*, 2016) e até mesmo pela suplementação do meio (Parrish, 2014). Ainda não foi estabelecido um marcador de fertilidade ideal para relacionar o reprodutor com a sua capacidade de fecundação espermática (Dejarnette, 2005; Dalton *et al.*, 2012).

Em relação aos meios de cultura utilizados para a FIV, recentemente foi demonstrado que o meio de cultivo TALP (Solução de Tyrode’s, acrescida de albumina, lactato e piruvato), suplementado com cafeína e teofilina para auxiliar na capacitação espermática no sêmen sexado, incrementa as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, sem aumentar a polispermia (Ferré *et al.*, 2015; 2016). No entanto, o agente mais utilizado para promover a capacitação espermática é a heparina, onde esta pode ser utilizada em diferentes concentrações de acordo com a necessidade do reprodutor, e apresenta resultados satisfatórios na produção de blastocistos (Parrish, 2014; Santana *et al.*, 2016). Muitos laboratórios associam a utilização da heparina com o PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina), para potencializar a capacitação dos espermatozoides e assim a RA e conseqüentemente a penetração na ZP (Gordon, 2003). Recentemente foi demonstrado que a heparina combinada com o PHE, reduz a qualidade espermática, em relação a integridade da membrana, do acrossoma e atividade mitocondrial, no entanto, desempenha um papel importante na capacitação espermática, melhorando a formação dos pronúcleos e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* (Gonçalves *et al.*, 2014).

Para a utilização dos espermatozoides em técnicas de reprodução assistida, além do meio de cultura utilizado durante o procedimento de FIV, é necessário realizar a seleção artificial dos espermatozoides, para selecionar uma população espermática que possua um maior número de células móveis e morfologicamente normais, além de remover componentes do diluente, plasma seminal, *debris* celulares e agentes infecciosos, de forma rápida, fácil e de baixo custo (Henkel e Schill, 2003). A influência dos métodos de preparação espermática na PIV de embriões vem sendo amplamente estudada, com o intuito de incrementar a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, maior motilidade, integridade de membrana e acrossoma (Mehmood *et al.*, 2009); o que é um passo importante para melhorar as taxas de fecundação *in vitro*, e conseqüentemente incrementar a produção de blastocistos aptos a serem inovulados e/ou

criopreservados. A qualidade espermática, bem como as demais etapas da PIV, está diretamente relacionada com a qualidade dos embriões, onde embriões que clivam mais cedo têm maiores chances de chegar a etapa de blastocisto, apresentando maior tolerância a criopreservação (Lonergan *et al.*, 1999; Barreta *et al.*, 2012).

2.2.1. Seleção Espermática

A seleção espermática é um requisito fundamental para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante, e deve proporcionar além de uma recuperação eficiente, a manutenção da integridade celular. Diferentes métodos vêm sendo propostos para a seleção espermática, sendo o método de Gradiente Descontínuo de Percoll® e o método de migração ascendente (*Swim up*) os mais utilizados nos protocolos de FIV (Parrish *et al.*, 1995; Cesari *et al.*, 2006; Morrell, 2006; Samardzija, *et al.*, 2006a; Ricci *et al.*, 2009). É sabido que o método de *Swim up* resulta na obtenção de espermatozoides de qualidade superior, no entanto, a taxa de recuperação é inferior aquela proporcionada pelo método de Percoll® (Parrish *et al.*, 1995; Cesari *et al.*, 2006; Morrell, 2006). Entretanto o Gradiente Descontínuo de Percoll® é o método considerado de eleição na maioria dos laboratórios comerciais de PIV de embriões bovinos (Cesari *et al.*, 2006), por ser a técnica que permite uma maior recuperação espermática.

2.2.1.1. Gradiente Descontínuo de Percoll®

Há diversas características a serem consideradas para se estabelecer um gradiente de densidade ideal, onde vários meios foram desenvolvidos com aplicações específicas. Um dos principais requisitos para o gradiente é que ele deve ser capaz de formar uma solução com diferentes densidades, com a capacidade de realizar separações eficientes, sem apresentar propriedades prejudiciais às partículas (Ford *et al.*, 1994). Além disso, há alguns obstáculos a serem superados, tais como a toxicidade, alterações na pressão osmótica, e a capacidade de penetração nas células (Pertoft, 2000). Tradicionalmente, o Percoll® tem sido empregado como

um gradiente de densidade na seleção espermática durante a produção *in vitro* de embriões (Cesari *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009).

O Percoll® é composto por partículas de sílica com 15 a 30nm de diâmetro, recobertas com polivinilpirrolidona (PVP), responsáveis por reduzir as propriedades tóxicas do gel (Samardzija, *et al.*, 2006a). Este colóide tem como vantagem não penetrar em membranas biológicas, sendo usado com sucesso há décadas na seleção espermática de diferentes espécies mamíferas (Pertoft, 2000), mesmo após a sua proibição em técnicas de reprodução assistida em humanos no ano de 1996, decorrente de relatos de contaminação por endotoxinas (Biotech, 1996). A partir desta data, diferentes substitutivos foram lançados no mercado e estão sendo utilizados com sucesso, no entanto, trabalhos realizados com sêmen bovino não demonstram os incrementos destas técnicas, quando comparado ao Percoll® (Samardzija, *et al.*, 2006b), sendo sua melhor capacidade de seleção relacionada à osmolaridade e densidade do colóide (Morrell *et al.*, 2011).

O Percoll®, já foi utilizado com o intuito de produzir um desvio de sexo na produção de embriões baseado nas características físicas dos espermatozoides, neste caso o peso, onde o espermatozoide X (fêmea) apresenta maior densidade (0,06%) em relação ao espermatozoide Y, sendo possível sua obtenção com maior facilidade no sedimento da amostra, uma maior desvio para espermatozoides fêmeas foi observado ao utilizarem um gradiente de Percoll contínuo com a densidade de 67,5% (Wolf, *et al.*, 2008). Lima e colaboradores (2011) utilizaram 13 gradientes, variando de cinco à doze densidades diferentes, e em alguns tratamentos foi possível obter uma acuidade de até 75%. Apesar da acuidade da técnica, a recuperação espermática, o tempo e a repetibilidade do método ainda devem ser aprimorados.

O Percoll® apresenta densidade diferente em relação às demais células, entre elas os espermatozoides, permitindo que estes sejam recuperados sob este gradiente. O método de Gradiente Descontínuo de Percoll® consiste na formação de um gradiente com diferentes densidades, onde esta aumenta no sentido da camada superior para a inferior; permitindo a seleção e passagem dos espermatozoides de acordo com a sua densidade, estágio de maturação e integridade (Pertoft, 2000). Durante a técnica de seleção espermática, os espermatozoides mortos, imóveis ou com alterações na membrana plasmática apresentam carga positiva e se ligam facilmente a PVP, que possui carga negativa, ficando então retidos durante os processos de incubação e centrifugação (Anzar e Graham, 1996), o que permite a obtenção de espermatozoides

de melhor qualidade no *pellet* formado. Além disso, os espermatozoides móveis conseguem migrar mais facilmente na direção da força centrífuga, permitindo a formação do *pellet* mais rapidamente (Morrell, 2006).

A metodologia usual da técnica de separação por gradiente de Percoll® preconizava a utilização de duas densidades (90 e 45%) com um volume médio de 2 mL por densidade, com duas centrifugações com uma baixa força por um período maior de tempo (Parrish *et al.*, 1995). Na busca de uma máxima recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, várias modificações foram feitas no método de Gradiente Descontínuo de Percoll® ao longo dos anos, especialmente na última década, devido à expansão do mercado para os embriões produzidos por FIV, e a introdução do sêmen sexado (Dell'aqua Jr *et al.*, 2006). A maioria das modificações se refere ao volume e número de densidades, assim como redução no tempo e aumento na força de centrifugação (Machado *et al.*, 2009; Folchini *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2014).

Protocolos denominados de “Mini-Percoll®”, utilizando volumes bastante reduzidos, inicialmente propostos para a separação de sêmen sexado, atualmente estão sendo empregados com sucesso na FIV com sêmen sexado ou convencional (Machado *et al.*, 2009; Folchini *et al.*, 2012) e demonstraram que, quando utilizadas às densidades 90, 60 e 30% para a seleção dos espermatozoides, obtêm-se valores semelhantes para a taxa de recuperação e morfologia espermática; no entanto, observou-se uma menor produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) quando comparado ao protocolo padrão, utilizando as densidades 90 e 45% para compor o gradiente (Folchini *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo (EO) seminal se desenvolve como resultado de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes (Sharma e Agarwal, 1996). As células espermáticas são extremamente sensíveis ao dano oxidativo, devido ao elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua membrana plasmática (Alvarez e Storey, 1993). Levando a um aumento na peroxidação lipídica, que culmina com perda da fluidez da membrana espermática, alterações nos padrões de motilidade e da capacidade fecundante (Silva *et al.*, 2007). Diversos fatores desencadeiam o EO, entre eles destacam-se os fatores iatrogênicos, ocasionados, por exemplo: pelos métodos de reprodução assistida como a centrifugação realizada durante a separação espermática. Apesar dos efeitos deletérios causados pelo EO, estudos sugeriram que a capacitação pode ser parte de um processo oxidativo e as EROs podem participar na indução da hiperativação e capacitação, processos estes necessários para os espermatozoides para adquirirem

a capacidade fecundante (Aitken, 1999; O'flaherty *et al.*, 1999). Mas este efeito é dependente do equilíbrio entre as quantidades de EROs e a atividade antioxidante (Gonçalves *et al.*, 2010).

2.2.1.2. Efeito da centrifugação nas células espermáticas

Apesar da sua praticidade alguns autores acreditam que a etapa de centrifugação presente na seleção espermática por diferentes gradientes de Percoll®, submete os espermatozoides a forças mecânicas que podem danificar suas membranas e causar morte celular, sendo considerada um dos principais entraves da técnica (Aitken e Clarkson, 1988; Strehler *et al.*, 1998). A centrifugação visa a remoção do plasma seminal, do diluente e de resquícios do colóide, além do aumento da concentração de espermatozoides. No entanto, esta etapa é responsável por causar danos estruturais aos espermatozoides, bem como a queda na motilidade, consequentemente interferindo nas taxas de FIV (Parrish *et al.*, 1995; Matás *et al.*, 2007), principalmente quando o procedimento é realizado com sêmen previamente submetido a criopreservação (Sharma *et al.*, 1997).

Alguns estudos indicam que os espermatozoides de algumas espécies, como bovinos e equinos, apresentam uma menor sensibilidade às forças de centrifugação (Sharma e Agarwal, 1996; Sharma *et al.*, 1997; Katkov e Mazur, 1998), apesar das forças empregadas nestes trabalhos serem relativamente baixas quando comparadas as aplicadas atualmente na maioria dos laboratórios de PIV no Brasil (Dell'aqua Jr *et al.*, 2006). Em 2006, Ponchirolli e colaboradores (2006) demonstraram que uma diminuição no volume do gradiente de Percoll® e no tempo de centrifugação, bem como um aumento na força de rotação, apresentou resultados satisfatórios tanto na utilização de sêmen convencional como na utilização de sêmen comercial sexado. Machado e colaboradores (2009) utilizaram com sucesso a força de 5000 x G por 5 minutos para a seleção de espermatozoides bovinos, demonstrando que ao combinar o aumento da força com a diminuição do tempo de centrifugação, mantém-se a viabilidade e a recuperação espermática.

O método de gradiente descontínuo de Percoll®, apesar de prejudicar os espermatozoides devido a centrifugação, segue sendo a técnica de eleição para a seleção espermática prévio a FIV, pois apresenta maior taxa de recuperação, sendo este um dos principais requisitos para a PIV

(Parrish *et al.*, 1995). Desta forma, estudos vêm buscando alternativas visando minimizar as injúrias que comprometem a viabilidade espermática, de forma a incrementar as biotécnicas da reprodução.

2.2.2. Sistema de amortecimento

A intensificação do uso das biotecnologias de reprodução assistida exigiu o desenvolvimento de métodos de preparação de sêmen que permitisse maximizar a recuperação de espermatozoides viáveis de um mesmo ejaculado (Stuhtmann *et al.*, 2012). Neste sentido, procurou-se alternativas para aperfeiçoar a técnica de seleção espermática, prevenindo ou minimizando os danos causados aos espermatozoides durante a etapa de centrifugação, desenvolvendo-se assim um sistema de amortecimento (Saragusty *et al.*, 2009). Esta técnica foi desenvolvida utilizando uma solução colóide, inerte, e de elevado peso molecular, que atuaria como uma suspensão para os espermatozoides, permitindo que o *pellet* formado após o processo de centrifugação fosse obtido sobre a solução, e não aderisse à parede do tubo, reduzindo os danos causados durante a centrifugação, e ao mesmo tempo, aumentando a recuperação de espermatozoides (Alvarez *et al.*, 1993). Esta técnica foi desenvolvida inicialmente para reduzir os danos causados pela centrifugação aos espermatozoides humano (Alvarez *et al.*, 1993), e desde então vem sendo utilizada com sucesso para proteger as células espermáticas durante a centrifugação prévia ao congelamento do sêmen equino (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005) e suíno (Matás *et al.*, 2007).

2.2.2.1. Solução de Iodixanol

Para o sistema de amortecimento, é utilizado um gradiente de densidade iodado, o iodixanol (5,5' [(2-hidroxy-1,3-propanediyl) –bis (acetylamino)] bis [N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl) -2,4,6-triiodo-1,3- benzenedicarboxylate]; Harrison, 1997), uma solução

coloidal, que se apresenta como uma forma não iônica, iso-osmótica, não-tóxica, além de ser solúvel em água (Ford *et al.*, 1994),

Em equinos, Len e colaboradores (2013) demonstraram que o amortecimento protege as células durante altas forças de centrifugação, incrementando a motilidade espermática, bem como a integridade da membrana plasmática e do acrossoma; resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (Waite *et al.*, 2008; Stuhmann *et al.*, 2012). Apesar das vantagens descritas sobre o amortecimento, alguns resultados sugerem que esta alternativa não é capaz de selecionar uma população de espermatozoides mais resistentes aos procedimentos de criopreservação e consequente descongelamento (Mari *et al.*, 2015).

O amortecimento durante a centrifugação do sêmen equino não interferiu na taxa de espermatozoides morfológicamente normais, e/ou no número de cabeças isoladas quando comparado a centrifugação normal e ao SpermFilter (Roach *et al.*, 2016). Em relação à taxa de recuperação, os resultados são bastante divergentes, onde alguns estudos demonstraram um aumento ou manutenção da recuperação espermática (Sieme *et al.*, 2003; Ecot *et al.*, 2005; Bliss *et al.*, 2012), enquanto outros perceberam uma diminuição (Len *et al.*, 2013). Este mesmo autor associa a baixa recuperação dos espermatozoides com a difícil manipulação da técnica; esta dificuldade pode estar relacionada com a semelhança entre o *pellet* formado pelos espermatozoides e a solução colóide.

Para o sêmen suíno, o amortecimento prévio ao congelamento foi aplicado como uma alternativa que permitiu manter a recuperação espermática, sem afetar a qualidade dos espermatozoides (Matás *et al.*, 2007). Recentemente, a solução de iodixanol foi testada não como uma técnica de amortecimento, e sim com o intuito de remover contaminantes do sêmen de garanhão, mais especificamente, urina, cuja presença está associada a queda na motilidade espermática. No estudo foi demonstrado que o amortecimento permite a redução nos danos causados por diferentes concentrações de urina no sêmen, tanto na motilidade como na qualidade do DNA espermático. Acredita-se que a capacidade de remoção deste contaminante com o iodixanol, ocorra pela passagem dos sólidos urinários (fração insolúvel) pela solução, enquanto os espermatozoides são recuperados sobre o colóide (Voge *et al.*, 2016).

Em bovinos, o uso de um colóide para a centrifugação do sêmen prévio ao congelamento, já foi testado, mas não com o intuito de se avaliar o amortecimento, e sim como uma alternativa para selecionar os espermatozoides antes de adicionar o diluente (Goodla *et al.*, 2014; Morrell *et*

al., 2014). Outro estudo avaliou a capacidade crioprotetora do iodixanol, e demonstrou que quando utilizado em uma concentração de 2,5% da solução junto ao diluente, o colóide irá proteger as membranas plasmáticas além de preservar a motilidade pós-descongelamento (Saragusty *et al.*, 2009). No entanto não existem trabalhos utilizando a centrifugação com amortecimento para a seleção de espermatozoides bovinos prévio a FIV, de forma a incrementar as taxas de produção *in vitro* de embriões.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método de seleção espermática que minimize as lesões espermáticas produzidas pela centrifugação durante o protocolo de mini Percoll® modificado, sem reduzir as taxas de recuperação espermática, e que permita incrementar a produção de embriões bovinos *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos:

Avaliar a eficiência do amortecimento com a solução de iodixanol durante as diferentes etapas de centrifugação para a seleção espermática de espermatozoides bovinos, através da taxa de recuperação espermática, cinética espermática e produção de estresse oxidativo.

Avaliar a cinética de desenvolvimento embrionário, bem como a taxa de fecundação, clivagem, momento da primeira clivagem e blastocistos produzidos; a partir do sêmen convencional selecionado com o método do Mini Percoll® sem e com amortecimento.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que foi submetido ao periódico *Theriogenology*.

ARTIGO CIENTÍFICO

CUSHIONED CENTRIFUGATION DURING SPERM SELECTION INCREASES THE FERTILIZATION AND CLEAVAGE RATES OF CATTLE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

Manuscript Number: THERIO-D-16-00424

Pavin, C.U.M.¹; Leivas, F.G.¹; Santos, F.W.¹; Folchini, N.P.¹; Missio, D.¹; Brum, D.S.^{1*}

¹ Federal University of Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab Biotechnology of
Reproduction, 97.500-970, Urugaiana, RS, Brazil.

* Corresponding author. Rod. BR 472, Km 587, Cx. Postal 118 - 97.500-970, Tel/fax.:
+555534134321. E-mail: danisbrum@unipampa.edu.br (D.S. Brum).

Abstract

This study aimed to evaluate the cushioned centrifugation using an iodixanol solution on sperm selection for *in vitro* production (IVP) of bovine embryos. In experiment I, the thawed semen was divided into four groups and the sperm subjected to the separation method by discontinuous Percoll® gradients with and without a colloid solution, where the cushioning was tested in the first (C1), second (C2), and both centrifugations (C1-2). Then, the recovery rate, sperm kinetics, and production of reactive oxygen species (ROS) were evaluated. Experiment II evaluated the fertilization rate and embryonic development kinetics of C and C1 groups; who were the treatments that have shown the best results for motion kinetics, recovery rate, and biochemical analysis in Experiment I. In this assay, the group with cushioning obtained an increase in the fertilization and cleavage rate when compared with the control (60.5 vs 48.55 and 80.0 vs 64.7%, respectively). With this study, we can conclude that the use of a cushion solution during centrifugation on sperm selection had preserved the motion properties of spermatozoa and the integrity of the sperm membrane without lowering the recovery rate. Furthermore, it was demonstrated for the first time that the use of cushioned centrifugation increases not only the cleavage rate but the number of embryos previously cleaved.

KEYWORDS: semen, bovine, IVP, discontinuous Percoll® gradients

1. Introduction

The *in vitro* production of bovine embryos has been widely incorporated in animal breeding programs, and has demonstrated a significant increase worldwide in recent years, achieving a record amount in 2013, where 42% of embryos produced were derived from *in vitro* fertilization (IVF) [1]. In order to optimize bovine IVF, sperm selection methods have been used to isolate sperm subpopulations with high fertilizing capacity for use in animal breeding [2]. According to Henkel and Schill [3], the ideal sperm separation technique should be quick, easy, and effective; must isolate as many motile spermatozoa as possible without causing sperm damage or physiological alterations; and must eliminate dead spermatozoa, other cells, and toxic or bioactive substances such as incapacitating factors or reactive oxygen species (ROS).

Among the methods of sperm selection, the most common method used commercially for the production of *in vitro* cattle embryos is the Discontinuous Percoll® Gradients (DPG) [4]. However, despite the technical practicality, changes in the protocols have been proposed, with the aim of reducing cell damage and increasing sperm recovery rate. Protocols with reduced volumes of Percoll® are currently being successfully used in IVF for sexed semen and conventional [5], as well as changes in the number of gradients [6], and the force and centrifugation time, making it a faster and more efficient procedure [7]. However, again despite the practicality of this technique, the centrifugation step is harmful, accounting for structural damage in sperm and decrease in motility and sperm recovery rate, as well as interfering with *in vitro* fertilization rates [8, 9]. Guimarães *et al.* [7] demonstrated that in bovine semen, a reduction of centrifugation force increases the *in vitro* penetration and fertilization rate.

Alvarez *et al.* [10] developed a cushioned centrifugation technique in order to reduce damage to human sperm and increase the recovery rate, which is used for processing semen prior to freezing. For damping, Alvarez *et al.* used a colloidal solution – iodixanol – which is a nonionic, iso-osmotic, nontoxic, water soluble medium [11]. Furthermore, the iodixanol solution has a higher density than the semen, and therefore the sperm are recovered on this layer, unlike what is routinely observed in sperm selection with different gradients, where the spermatozoa are obtained in the pellet, along with cellular debris and reactive oxygen species [12]. Some research has shown that the addition of this colloidal solution during centrifugation of stallion semen increased the recovery of motile and functionally capable sperm [13-15]. However, boar semen

studies demonstrated recovery rate and motility similar to the conventional method [9]. In bulls, a study evaluating the cryoprotective capacity of iodixanol was developed, and demonstrated that the solution protects cell membranes while preserving the post-thaw motility [16]. Nevertheless, although there were no studies so far using cushioned centrifugation for bull sperm selection for in IVP, we believe that this technique could increase the semen quality for IVF.

Based on the above issues, the aim of the present study was to evaluate the protective ability of iodixanol during sperm selection by the method of modified DPG. Factors evaluated were recovery rate, sperm kinetics, and production of reactive oxygen species, as well as the embryonic development.

2. Materials and Methods

All chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

2.1. Experimental design

For this research, two experiments were developed; and for both studies we used frozen semen from *Bos taurus taurus* bulls. All of the samples (0.5-mL straws) were from the same commercial batch. In experiment I (6 replicates), the semen samples were homogenized after thawing and aliquoted into four groups: Control (C), with only the DPG; treatment C1, which added 150 µl of cushioned media (CushionFluid® - Minitube, Tiefenbach embryos, Germany) under the gradient in the first centrifugation; C2, with the addition of the same amount of the colloid in the second centrifugation; and C1-2, with both cushioned centrifugations. After centrifugation, the semen samples were used to determine the effects of the cushion solution on sperm parameters, like sperm kinetics, membrane integrity, and the production of ROS.

In experiment II (5 replicates), the semen samples were divided in two groups: Control (C), and C1, which has the cushion solution only in the first centrifugation, and which demonstrated better results in Experiment I. In this experiment, we evaluated fertilization rate and the kinetics of embryonic development up to day 7 after IVF.

2.2. Oocyte recovery and *in vitro* maturation (IVM)

Bovine ovaries were obtained at the slaughterhouse and transported to the laboratory in physiological saline (0.9%) with antibiotics (100IU/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin) at 30°C. Cumulus oocyte complexes (COCs) from 2- to 8-mm diameter follicles were aspirated with a vacuum pump (vacuum rate of 20mL of water/min). The COCs were recovered and only oocytes with homogenous ooplasm and intact cumulus layers were selected for further processing. Groups of 35 COCs were transferred to 4-well plates containing 400 µL of modified TCM-199 media with 10% estrous mare serum (Biotech, Uruguaiana, RS, Brazil) to IVM. This medium was supplemented with 5 µg/mL of porcine follicle stimulating hormone, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 50 µg/mL of porcine pituitary luteinizing hormone, LH-P (Lutropin-V®, Bioniche Animal Health), 100 µg/mL of human epidermal growth factor (hEGF), and 22 µg/mL of pyruvate and gentamicin. For IVM, the COCs were cultured for 24 h at 39°C in a gaseous atmosphere with 5% CO₂ and saturated humidity.

2.3. Sperm selection procedures

An isotonic Percoll® solution was used for the preparation of 90, 60, and 30% solutions with modified Talp-Fert media [17]. The Percoll® density gradient was created by layering 300 µL of each solution into a 1.5-mL Eppendorf® tube, starting with the 90% Percoll® solution in the bottom of the tube, in groups: control (C) and (C2). The others groups, C1 and C1-2, had 150 µL of CushionFluid® added prior to the Percoll 90%. On the top of the gradient, 150 µL of

thawed semen was layered, and the tubes were centrifuged for 5 min at $2200 \times g$ [7]. The pellets were resuspended in 300 μL of Talp-Fert, according to treatment, without (C and C1) or with (C2 and C1-2) 150 μL cushion solution, and centrifuged again for 1 min at $2200 \times g$.

2.4. *In vitro* fertilization (IVF)

After sperm processing and analyses, the semen was used for IVF. Droplets containing 150 μL modified Talp-Fert medium [18], 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pyruvate, 6 mg/mL BSA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin, 20 $\mu\text{M}/\text{mL}$ penicillamine, 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ hypotaurine, and 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ epinephrine were prepared in 30×10 mm dishes (Corning Incorporated Life Sciences), under mineral oil, for COCs fertilization (Day 0) with 2×10^6 sperm/mL. The sperm and oocyte co-culture was performed at 39°C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO_2 in air.

2.5. *In vitro* culture (IVC)

The cumulus oophorus cells were removed by successive pipetting of potential zygotes. The IVC medium was Synthetic Oviduct Fluid with amino acid, citrate, and myoinositol (SOFaaci) [19]. The embryos were transferred individually to the micro-wells of a well-of-the-well (WOW) culture dish (Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary) and cultured in groups under mineral oil at 39°C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO_2 in air for 7 days. The cultures were incubated on the stages of compact digital inverted microscopes designed for use inside an incubator, allowing for automated time-lapse analysis (Primo Vision time-lapse embryo monitoring system; Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary).

2.6. Assessment of sperm quality parameters

2.6.1. Sperm kinetics

The sperm kinetics was evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system fitted with the Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The following parameters were analyzed: total motility (MOT; %), progressive motility (PM; %), straight-line velocity (VSL; mm/s), curvilinear velocity (VCL; mm/s), average path velocity (VAP; mm/s), straightness (STR; %), linearity (LIN; %), amplitude of lateral head displacement (ALH; mm), tail beat frequency (TBF; Hz), and percentage of sperm with rapid movement (Hyperactivity; %).

2.6.2. Sperm concentration and recovery rate

For measuring the concentration, the semen samples were diluted (1:10) in 180 μ L of formaldehyde solution. The counting was performed in a hematic Neubauer chamber under 400x magnifications. The recovery rate was calculated according to Machado *et al.*[5].

2.6.3. Membrane integrity

The plasma membrane integrity was evaluated by the technique described by Harrison and Vickers [20], using a mixture of two probes of propidium iodide (PI) and carboxy fluorescein diacetate (CFDA), where after the incubation, 200 spermatozoa under 400x magnification with epifluorescence illumination were counted. Spermatozoa that fluoresced green throughout their length after staining with CFDA were classified as being intact, while the cells that showed some red coloration from the PI were considered damaged.

2.6.4. Production of ROS

ROS levels were measured by a spectrofluorimetric method [21] where the sperm are incubated in Tris-HCl in the presence of 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at 37°C. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. DCHF-DA is a stable, cell-permeable nonfluorescent probe. It is de-esterified intracellularly and becomes the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was used to detect and measure the intracellular ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) using a Shimadzu spectrofluorometer (model RF5301PC, Japan). ROS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

2.7. Kinetics of embryonic development

2.7.1. Fertilization rate

Fertilization rate was evaluated after 18 h of co-incubation of the oocytes and spermatozoa. For the evaluation, potential zygotes were stripped and stained with 15 µg/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342; Life Technologies, Japan) in PBS. Images of the potential zygotes were examined under an epifluorescence microscope at 400x magnification with the excitation wavelength at 365 nm and the emission wavelength at 410 nm. As described by Giotto *et al.* [22], we considered the total fertilization rate when the oocyte had two or more pro nuclei or a fused nucleus. However, for normal fertilization rate, we considered the oocytes with only two pro nuclei or fused nuclei.

2.7.2. Cleavage and embryonic development

The image capture frequency was set to 5 min. The embryos were individually evaluated on day 2 for cleavage and cell number as well as the time elapsed until the moment of first cleavage. The embryo development and the blastocyst rates were evaluated on day 7 of the culture period and evaluated using IETS recommendations.

2.8. Statistical analysis

The effects of the cushioned centrifugation on sperm quality parameters, such as spermatoc kinetics, membrane integrity, recovery rate, and production of ROS, were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. All the data were analyzed on the software STATISTICA '99 Edition (StatSoft, Inc. 1999). For the analysis of embryonic development kinetics, as well as fertilization rate, we used a Chi-square test. Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Experiment 1

The sperm kinetics evaluated by the CASA showed that treatments C1 and C2 were similar to the control group (C) in motility, progressive motility, hyperactivity, and amplitude of lateral head displacement (ALH). Additionally, the control group (C) was higher than the C1-2 group (Table 1). In other parameters of sperm kinetics, no significant difference ($P > 0.05$) was obtained.

Regarding the membrane integrity, there was no significant difference between treatments, with the average being 73.4%. The recovery rate was higher in C and C1 when compared with C2 and C1-2 (26.6, 29.9, 12.7, and 11.4%, respectively). Figure 1 summarizes the results from the biochemical evaluation of the production of reactive oxygen species using spectrofluorimetric method, where the treatment groups (C1, C2, and C1-2) demonstrated decrease in the production of ROS (the average between the groups was 26.5 UF) when compared with the control (35.2 UF).

3.2. Experiment 2

To evaluate the influence of sperm selection on the embryonic development, we used a control group (C) and treatment with an iodixanol density solution during the first centrifugation (C1). The treated group (C1) had a higher rate of normal and total fertilization when compared to the control group (C), which had the highest penetration rate (Table 2). In embryonic development, the cleavage rate of the C1 is greater than the C group (Table 2). The time of first cleavage and the number of cells at 48 h post-insemination (hpi) were similar between treatments, where the averages of treatments were 30.1hpi for cleavage and 3.9cells at 48hpi. On analyzing the moment of cleavage of each embryo according to the group, it was observed that embryos treated with iodixanol solution had a greater rate of cleavage ($P < 0.05$) prior to 28hpi compared to the control group (32.5 and 18.8%, respectively).

In relation to the total of embryos produced (early blastocyst, blastocyst, and expanded blastocyst) in D7, there was no significant difference between treatments. The morulae rate in D7 was higher in group C than group C1. However, the blastocyst rate in the C1 group was better than the C group (Table 3).

4. Discussion

Discontinuous Percoll® Gradients is the method most widely used to prepare bull sperm for IVF [5, 18]. Different conditions for gradient density centrifugation with different Percoll® concentrations, number of layers, and centrifugation regimen are described [5-7]. Nevertheless, centrifugation is a potentially sperm-damaging step in sperm processing [5]. This study showed, for the first time, that use of a cushioned centrifugation during sperm selection for IVP decreases the production of ROS, besides increasing cleavage rates and the number of embryos that cleaved previously.

In our study we used the DPG method as described by Guimarães *et al.* [7], which involves using a force of $2200 \times g$ only in the first centrifugation. However, we adapted the technique, and used the same force in both centrifugations [23]. Although the protocol has undergone slight changes over the years, no data exist about cushioned centrifugation. With increasing utilization of sexed sperm, changes in Percoll® protocols have been proposed, aiming to increase the sperm recovery rate, in order to optimize the use of semen [24]. In our study, when we used the cushion solution in the first centrifugation, the recovery-rate results were similar to the control, agreeing with previous studies that consider the recovery rate an advantage of cushioned centrifugation [13, 15, 25]. However, Len *et al.* [14] obtained a low recovery rate using a cushion solution during the centrifugation, and they consider the process cumbersome to those who have no experience with the technique.

In this study, the sperm kinetics evaluated by the CASA, for analysis of total motility, progressive motility, hyperactivity, and ALH, were similar between the control group (C) and the treatments where one of the centrifugations was cushioned (C1 and C2). As cited by Verstegen *et al.* [26] and Bliss *et al.* [27], the measurement of ALH is related to the sperm's ability to penetrate the zona pellucid of the egg, and is one of the parameters that has an effect on fertilization; as well as the hyperactivity, which is related to the sperm capacitation and fertilization. Probably, these results could explain the values that we obtained in the embryonic development. In a recent study, Papa [28] demonstrated that this sperm characteristic, ALH, was higher in the group with the better pregnancy rate. The speed parameters (VCL, VSL, and VAP) are related to the fertility of the bull [29]; in this study this was not significantly different between treatments.

Sperm spontaneously produce a variety of reactive oxygen species (ROS), because they have a high concentration of polyunsaturated fatty acids and low antioxidant capacity [30]. However, when ROS production exceeds the limits of sperm's antioxidant defenses, this induces

an oxidative stress, which is characterized by peroxidative damage to the sperm plasma membrane [31]. In a recent study, Guimarães *et al.*[7] tested different forces of centrifugation, and the influence of different bulls, and achieved increased production of ROS using the same force centrifugation (2200 \times g). Recent studies have demonstrated that high concentrations of ROS in sperm could disrupt the fertilization and the ability of the spermatozoa to produce a normal and healthy embryo [32]. Our results demonstrate that the production of reactive oxygen species was higher in the control group, when compared with the treatments, where the values were lower. This leads us to believe that the cushioned centrifugation protects sperm cells from oxidative damage.

It is known that the semen used interferes with the sperm fertilization rate and subsequent embryonic development [9]. *In vitro* penetration and fecundation tests were found to be a good seminal assay and may improve the *in vitro* assessment of sperm's fertilizing ability [33]. Previous studies have shown that an increase in fertilization rate may be related to an optimum concentration of ROS that was clearly capable of stimulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation [34-36]. In our study, when using iodixanol density solution there was an increase in total and normal fertilization rate. However, the control group had a lower rate of normal fertilization and produced more ROS; this result is similar to that obtained Guimarães *et al.* [7]. Besides fecundation rate, another tool to evaluate the sperm capacity and the oocyte competence is the monitoring of the kinetics of the embryonic development. With this study, we can demonstrate that, as well as the fecundation rate, the cleavage rate was higher in C1 than in the control group (80 and 64.7%, respectively).

Some studies [37, 38] have reported that the moment of embryonic cleavage is directly related to the capacity for future development, suggesting that the earlier the division starts, the higher the chances of development until the blastocyst stage. Barreta *et al.*[38] demonstrated that embryos that begin the division before the 28hpi have greater competence development. Our work shows that the group treated with iodixanol solution had higher cleavage before 28 h, and consequently a greater production of blastocysts compared to the control group, which in turn showed a higher production of morulae.

5. Conclusions

The use of a cushion solution during centrifugation on sperm selection by the Discontinuous Percoll® Gradients method decreases the production of reactive oxygen species and preserved the motion properties of spermatozoa and the integrity of sperm membrane without lowering the recovery rate. Furthermore, it improves fecundation and cleavage rates, as well as the number of embryos that cleave earlier, providing greater potential of those embryos developing until the blastocyst stage.

6. Acknowledgments

The authors thank Alta Genetics Brazil and Minitube of Brazil that kindly provided the semen and the CushionFluid®.

7. References

1. Blondin P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction* 2015; 12:3.
2. Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 2003; 38:312-318.
3. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:108.
4. Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology* 2006; 66:1185-1193.
5. Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009; 71:1289-1297.
6. Folchini NP, Leivas FG, Santos FW, Schwengber ER, Martin D, Spiazzi CC, Brum DdS. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2012; 36:239-244.
7. Guimarães AC, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CI, Gonçalves CG, Folchini NP, Brum DS. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci* 2014; 146:103-110.
8. Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, Klug E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim* 2003; 38:134-140.
9. Matás C, Decuadro G, Martínez-Miró S, Gadea J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology* 2007; 67:1087-1091.
10. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod* 1993; 8:1087-1092.
11. Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* 1994; 220:360-366.
12. Stuhmann G, Oldenhof H, Peters P, Klewitz J, Martinsson G, Sieme H. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2012; 133:184-190.
13. Waite JA, Love CC, Brinsko SP, Teague SR, Salazar JL, Mancill SS, Varner DD. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 2008; 70:704-714.

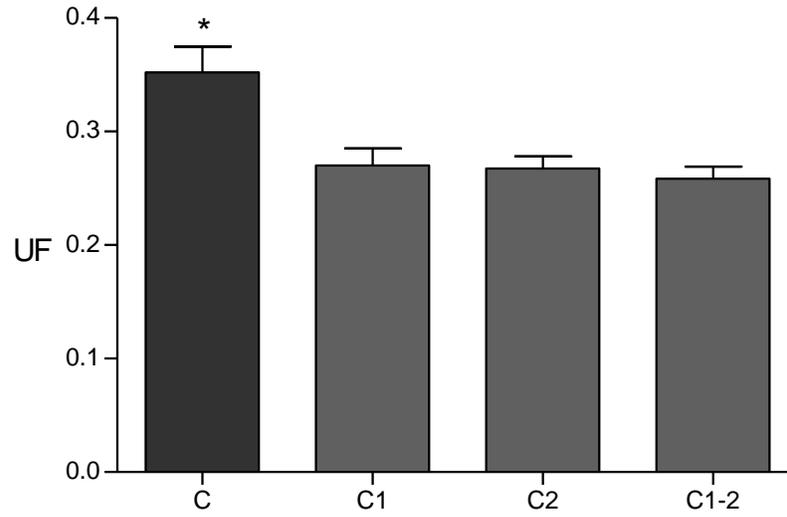
14. Len JA, Beehan DP, Lyle SK, Eilts BE. Cushioned versus noncushioned centrifugation: sperm recovery rate and integrity. *Theriogenology* 2013; 80:648-653.
15. Ecot P, Decuadro-Hansen G, Delhomme G, Vidament M. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:245-248.
16. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology* 2009; 71:1425-1432.
17. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.
18. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44:859-869.
19. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999; 52:683-700.
20. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; 88:343-352.
21. Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics Chemistry* 2005; 72:323-331.
22. Giotto AB, Brum DdS, Santos FW, Guimarães ACG, Gonçalves CGM, Pavin CUM, Folchini NP, Moyses AB, Missio D, Leivas FG. Oxygen tension and oocyte density during *in vitro* maturation affect the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Semina: Ciências Agrárias* 2015; 36:12.
23. Gonçalves, Moreira CG, Missio D, Carloto GW, Folchini NP, Brum DS, Leivas FG. A redução na força de centrifugação não diminui a recuperação espermática de sêmen bovino com baixa concentração de espermatozoides. In: II Workshop em Bovinos. Uruguaiana, Brasil: Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA; 2014: 22.
24. Dell'Aqua Jr JA, PAPA FO, Araújo Jr JP, Freitas CP, Ponchirolli CB, Figueiredo AS, Melo CM, Alberti K, Crespilho AM, Siqueira Filho ER, C O. The use of sexed semen on embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34 (Suppl 1):8.
25. Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:294-297.
26. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57:149-179.

27. Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology* 2012; 77:1232-1239.
28. Papa PM. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology* 2015; 83:107-113.
29. Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet Hung* 2015; 63:370-381.
30. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 216:31-39.
31. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25:2415-2426.
32. Hendricks KE, Hansen PJ. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. *Aust Vet J* 2010; 88:307-310.
33. Gadea J, Matás C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 1998; 54:95-108.
34. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115:1-7.
35. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59:939-949.
36. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 5):645-656.
37. Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999; 117:159-167.
38. Barreta MH, Gasperin BG, Rissi VB, Cesaro MP, Oliveira JF, Gonçalves PBD, Bordignon V. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. *Experimental Cell Research* 2012; 318:10.

Table 1: Sperm kinetics (mean \pm SD) by Sperm Class Analyzes (SCA) after sperm selection without (C) or with the cushion solution in the first (C1), second (C2), or both centrifugations (C1-2).

Item	C	C1	C2	C1-2
Motility (%)	66.4 \pm 16.2 ^a	54.5 \pm 19.5 ^{ab}	54.5 \pm 15.5 ^{ab}	42.8 \pm 15.2 ^b
Progressive Motility (%)	51.4 \pm 19.5 ^a	39.9 \pm 16.4 ^{ab}	43.4 \pm 21.7 ^{ab}	28.5 \pm 9.8 ^b
VCL (μ m/s)	70.1 \pm 12.4	67.2 \pm 15.3	62.8 \pm 14.8	55.4 \pm 7.9
VSL (μ m/s)	39.9 \pm 11.7	35.9 \pm 17.4	29.9 \pm 11	29.8 \pm 8.9
VAP (μ m/s)	44.4 \pm 11.6	43.8 \pm 17.6	36.2 \pm 10.2	35.1 \pm 8.7
LIN (%)	52.1 \pm 10.1	53 \pm 13.5	46.5 \pm 10.6	52.9 \pm 10
STR (%)	82.2 \pm 5.2	80.6 \pm 5.9	80.4 \pm 11.1	84.1 \pm 5.5
WOB (%)	62.9 \pm 8.4	63.8 \pm 12.1	57.2 \pm 7.2	62.6 \pm 8.9
ALH (μ m)	3.2 \pm 0,8 ^a	2.9 \pm 0,6 ^{ab}	2.8 \pm 0,4 ^{ab}	2.2 \pm 0,3 ^b
BCF (hz)	10.9 \pm 0.9	11 \pm 1.2	11.2 \pm 2.4	11.1 \pm 1.4
Hyperactivity (%)	24.8 \pm 17.1 ^a	13.8 \pm 10.9 ^{ab}	13.5 \pm 8.9 ^{ab}	7.9 \pm 4.7 ^b

^{a,b}Different superscripts in the same line indicate significant difference (P <0.05).



* Significant ($P < 0.05$).

Figure 1: Production of reactive oxygen species (ROS) by sperm after the sperm selection, without (C) or with the CushionFluid® in the first (C1), second (C2) or both centrifugations (C1-2).

Table 2: Total fertilization rate, normal fertilization, penetration, and cleavage from selected bovine sperm Discontinuous Percoll® Gradient method without (C) or with (C1) the iodixanol density solution.

Treatment	Total Fertilization		Normal Fertilization		Penetration		Cleavage	
	N	%	N	%	N	%	N	%
C	96/198	48.5 ^b	91/198	45.9 ^b	49/198	24.7 ^a	55/85	64.7 ^b
C1	124/205	60.5 ^a	115/205	56.1 ^a	32/205	15.6 ^b	68/86	80.0 ^a

^{a,b}Different superscripts in the same column indicate significant difference (P <0.05).

Total Fertilization: Oocyte with two or more pro nuclei or fused nucleus.

Normal Fertilization: Oocyte with only two pro nuclei or fused nuclei.

Penetration: One sperm head or a decondensed sperm nucleus in the oocyte.

Table 3: Embryonic development (D7) of the cleaved embryos from sperm selection by Discontinuous Percoll® Gradients method without (C) or with the addition of CushionFluid® (C1).

Treatment	Morulae		Early Blastocyst		Blastocyst		Expanded Blastocyst		Total of Blastocysts	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	C	16/46	34.8 ^a	11/46	23.9	1/46	2.2 ^b	1/46	2.2	13/46
C1	12/57	21.0 ^b	12/57	21.0	8/57	14.0 ^a	1/57	1.7	21/57	38.8

^{a,b}Different superscripts in the same column indicate significant difference (P <0.05).

5. CONCLUSÕES

- O uso do iodixanol como uma solução de amortecimento durante a seleção espermática proporcionou:
 - A manutenção da integridade de membrana, e diminuição da produção de EROs no sêmen,
 - Incremento na taxa de fecundação normal e total, assim como na taxa de clivagem e número de blastocistos produzidos,
 - Um maior número de embriões clivados antes das 28hpi;
- A solução de amortecimento durante a seleção espermática pode ser uma alternativa para touros que apresentam menores índices de fecundação e produção de embriões *in vitro*.

6. PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados obtidos, as perspectivas para futuros trabalhos são:

- Determinar os níveis de fragmentação de DNA e lesão em cromatina dos espermatozoides após a centrifugação com a solução de amortecimento;
- Avaliar o desenvolvimento embrionário, pelo Primo Vision, até o D7 de um maior número de embriões, podendo realizar uma melhor correlação entre o momento da primeira clivagem e a qualidade do embrião produzido;
- Testar a solução de iodixanol como amortecimento na seleção de espermatozoides sexados destinados a PIV de embriões bovinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? **J Reprod Fertil**, v. 115, n. 1, p. 1-7, Jan 1999.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **J Androl**, v. 9, n. 6, p. 367-76, 1988 Nov-Dec 1988.

ALVAREZ, J. G. et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. **Hum Reprod**, v. 8, n. 7, p. 1087-92, Jul 1993.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **J Androl**, v. 14, n. 3, p. 199-209, 1993.

ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 513-20, Jan 1996.

BARRETA, M. H. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. **Experimental Cell Research**, v. 318, p. 10, 2012.

BIOTECH, P. **Important notice: Percoll® not to be used in assisted reproduction technologies in humans**. Pharmacia Biotech Inc.: Piscataway, NJ, Dec 12 1996.

BLISS, S. B. et al. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1232-9, Apr 2012.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 3, 2015.

CESARI, A. et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1185-93, Sep 2006.

DALTON, J. C. et al. Fertility-associated antigen on Nelore bull sperm and reproductive outcomes following first-service fixed-time AI of Nelore cows and heifers. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 389-94, Jan 2012.

DEJARNETTE, J. M. The effect of semen quality on reproductive efficiency. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 21, n. 2, p. 409-18, Jul 2005.

DELL'AQUA JR, J. A. et al. The use of sexed semen on embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Suppl 1), p. 8, 2006.

DIELEMAN, S. J. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, Jan 2002.

ECOT, P. et al. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 245-8, Oct 2005.

FERRÉ, L. B. et al. Comparison of different fertilisation media for an *in vitro* maturation?fertilisation?culture system using flow-cytometrically sorted X chromosome-bearing spermatozoa for bovine embryo production. **Reprod Fertil Dev**, May 2015.

_____. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on *in vitro* bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, Feb 2016.

FOLCHINI, N. P. et al. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 239-244, 2012.

FORD, T.; GRAHAM, J.; RICKWOOD, D. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. **Anal Biochem**, v. 220, n. 2, p. 360-6, Aug 1994.

GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 943-57, Mar 2006.

GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. Past, Present and Future Perspectives on Sexing Sperm. **Canadian Journal of Animal Science**, 2003.

GONÇALVES, F. S. et al. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 1, p. 129-35, Feb 2010.

_____. Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine *in vitro* fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. **In vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 50, n. 1, p. 39-47, Jan 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2°. São Paulo - Brasil: 2008.

GOODLA, L. et al. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 4, p. 2204-12, Apr 2014.

GORDON, I. R. **Laboratory production of cattle embryos**. Biotechnology in Agriculture Series: CABI Publishing, p. 576, 2003.

GUIMARÃES, A. C. et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Anim Reprod Sci**, v. 146, n. 3-4, p. 103-10, May 2014.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-25, Jan 2006.

HARRISON, K. Iodixanol as a density gradient medium for the isolation of motile spermatozoa. **J Assist Reprod Genet**, v. 14, n. 7, p. 385-7, Aug 1997.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 108, Nov 2003.

INABA, Y. et al. Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of *in vitro* fertilized oocytes in a bull-dependent manner. **J Reprod Dev**, Jun 2016.

KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. **J Androl**, v. 19, n. 2, p. 232-41, 1998 Mar-Apr 1998.

KNOP, K. et al. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 294-7, Oct 2005.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 9, 2014.

LEE, H. L. et al. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **J Vet Sci**, v. 10, n. 3, p. 249-55, Sep 2009.

LEN, J. A. et al. Cushioned versus noncushioned centrifugation: sperm recovery rate and integrity. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 648-53, Oct 2013.

LIMA, V. F. M. H. D. et al. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 6, 2011.

LOBO, R. B. et al. Effect of Nellore bull variation on embryo *in vitro* production **Theriogenology**, v. 51, 1999.

LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **J Reprod Fertil**, v. 117, n. 1, p. 159-67, Sep 1999.

_____. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 4, p. 259-67, Aug 2003. ISSN 0936-6768.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, May 2009.

MARI, G. et al. Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 953-8, Apr 2015.

MATÁS, C. et al. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1087-91, Mar 2007.

MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; NAQVI, S. M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Anim Reprod Sci**, v. 111, n. 2-4, p. 141-8, Apr 2009.

MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reprod Domest Anim**, v. 41, n. 1, p. 63-7, Feb 2006.

MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of Osmolarity and Density of Colloid Formulations on the Outcome of SLC-Selection of Stallion Spermatozoa. **ISRN Vet Sci**, v. 2011, 2011.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ANDERSSON, M. Colloid centrifugation selects normal spermatozoa from polymorphic bull ejaculates: a case study. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 2, p. 281-4, Apr 2014.

NAGY, Á. et al. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Vet Hung**, v. 63, n. 3, p. 370-81, Sep 2015.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 289-301, Jul 1999.

PARRISH, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, Jan 2014.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 1995.

PERRY, G. **2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.** IETS. Versailles, France: Embryo Transfer Newsletter. 34: 8 p. 2014.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **J Biochem Biophys Methods**, v. 44, n. 1-2, p. 1-30, Jul 2000.

PONCHIROLI, C. B.; FONSECA, E. J.; MORENO, J. F. **Utilização de sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV).** Encontro entre Laboratórios de PIV na Lagoa da Serra, Ltda. Sertãozinho, SP - Brasil 2006.

RICCI, G. et al. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. **Fertil Steril**, v. 91, n. 2, p. 632-8, Feb 2009.

ROACH, J. et al. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. **Vet Rec**, v. 178, n. 10, p. 241, Mar 2016.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 4, p. 312-8, Aug 2003.

SAMARDZIJA, M. et al. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 58, 2006a.

_____. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Anim Reprod Sci**, v. 91, n. 3-4, p. 237-47, Feb 2006b.

SANTANA, P. P. et al. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1132-8, Apr 2016.

SARAGUSTY, J. et al. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1425-32, Jun 2009.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-50, Dec 1996.

SHARMA, R. K. et al. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. **Arch Androl**, v. 39, n. 1, p. 33-8, Jul-Aug 1997.

SIEME, H. et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 2, p. 134-40, Apr 2003.

SILVA, A. E. D. F. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros.** EMBRAPA, R. G. E. B. Série Documentos. 35: 37 p. 1998.

SILVA, P. F. et al. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 609-19, Feb 2007.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-54, Apr 2001.

STREHLER, E. et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae 13). **Hum Reprod**, v. 13, n. 1, p. 120-3, Jan 1998.

STUHTMANN, G. et al. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 133, n. 3-4, p. 184-90, Aug 2012.

SUAREZ, S. S. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. **Reprod Fertil Dev**, v. 19, n. 1, p. 103-10, 2007.

VIANA, J. H. M. V. et al. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38 (Supl 2), p. 14, 2010.

VOGE, J. et al. The effects of urine concentration, and cushion centrifugation to remove urine, on the quality of cool-stored stallion sperm. **Theriogenology**, v. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.070, 2016.

WAITE, J. A. et al. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 704-14, Sep 2008.

WARD, F. et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Mol Reprod Dev**, v. 60, n. 1, p. 47-55, Sep 2001.

WOLF, C. A. et al. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. **Anim Reprod**, v.5, n.3/4, p.110-115, Jul./Dec. 2008.

APÊNDICE A

O amortecimento durante a centrifugação na seleção de espermatozoides bovinos não reduz a taxa de recuperação

Pavin, C.U.M.*; Folchini, N.P.; Missio, D.; Mattos, K.; Pinto, H.F.; Brum, D.S.

BIOTECH – Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal. Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, RS, Brasil. E-mail: cecilia_machado@msn.com

INTRODUÇÃO: A seleção espermática é um requisito fundamental para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante, e existem diferentes métodos destinados a fecundação *in vitro* (FIV); sendo o método de gradiente descontínuo de Percoll® o mais utilizado comercialmente. Apesar dos avanços obtidos até o momento, a etapa de centrifugação presente nesta técnica é responsável por causar danos às células espermáticas, diminuindo a motilidade e taxa de recuperação (Sieme *et al.*, 2003). Com intuito de amenizar estes danos foi desenvolvida uma técnica de centrifugação com amortecimento, utilizando um colóide (iodixanol), para o processamento do sêmen prévio ao congelamento, sendo o protocolo utilizado para equinos (Saragusty *et al.*, 2007) e suínos (Matás *et al.*, 2007); no entanto, não existem trabalhos utilizando a técnica de amortecimento para a seleção de espermatozoides bovinos destinados a FIV.

OBJETIVO: Avaliar a taxa de recuperação (TR) e consequente proteção do iodixanol, durante a seleção espermática pelo método de mini Percoll, utilizando o amortecimento durante a centrifugação.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram realizadas 6 repetições, onde 3 palhetas de sêmen foram descongeladas, homogeneizadas e divididas em quatro grupos: o controle (C), sendo utilizado o protocolo padrão do laboratório com 300µL de cada densidade de Percoll 90, 60 e 30%, na primeira centrifugação, e 300µL de meio FERT-TALP para lavagem na segunda centrifugação (Guimarães *et al.*, 2014); o (C1) onde foi adicionado 300µL de CushionFluid (CF) prévio ao gradiente; (C2) contendo 150µL de CF abaixo do meio de lavagem; e o (C1-2) que recebeu o meio CF nas duas etapas. O *pellet* resultante da segunda centrifugação foi utilizado para a avaliação espermática pós-Percoll.

Os parâmetros de motilidade, velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- μm) e hiperatividade das células, foram avaliados pelo Sperm Class Analyzer (SCA). A TR foi obtida conforme Machado (2009). Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

RESULTADOS: Os parâmetros da motilidade obtidos no SCA não demonstraram diferença entre os tratamentos para VCL, VSL e VAP; no entanto o número de espermatozoides móveis, hiperativos e com maior ALH foi inferior no grupo com CF nas duas centrifugações (C1-2), quando comparado ao controle (Tab. 1). Em relação a TR, C e C1 foram semelhantes entre si e superiores ao C2 e C1-2 (26; 30; 12,7 e 11,4%, respectivamente) (Fig. 1).

DISCUSSÃO: Acredita-se que o decréscimo nos parâmetros da motilidade observada no C1-2, possa ser em decorrência da presença do CF, em ambas as centrifugações, nos demais grupos o amortecimento não foi capaz de proteger os espermatozoides, permitindo maior motilidade espermática, diferente do que foi descrito anteriormente (Stuhtmann *et al.*, 2012, Len *et al.*, 2013). A TR apresentou-se inferior nos tratamentos com CF na segunda centrifugação (C2 e C1-2), e assim como observado em outros estudos, estes valores têm relação com a semelhança do pellet com o iodixanol, o que dificulta a manipulação (Len *et al.*, 2013)

CONCLUSÃO: O presente estudo demonstrou que o amortecimento na primeira centrifugação não reduziu a taxa de recuperação espermática; no entanto, não demonstrou uma ação protetora nas variáveis analisadas, sendo necessária a avaliação de outros parâmetros, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de embrião.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guimarães A.C., Leivas F.G., Santos F.W. et al. 2014. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci.* 146:103-10.
- Len J.A., Beehan D.P., Lyle S.K. et al. 2013. Cushioned versus noncushioned centrifugation: sperm recovery rate and integrity. *Theriogenology.* 80:648-53.
- Machado G.M., Carvalho J.O., Siqueira Filho E. et al. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 71:1289-97

Matás C., Decuadro G., Martínez-Miró S. et al. 2007. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*. 67:1087-91.

Saragusty J., Gacitua H., Pettit, M.T. et al. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reprod Domest Anim*.42:610-5.

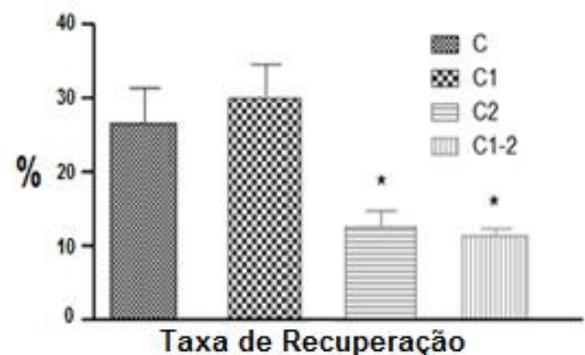
Sieme H., Martinsson G., Rauterberg H. et al. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim*.38:134-40.

Stuhtmann G., Oldenhof H., Peters P., et al. 2012. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 133:184-90

Tabela 1: Parâmetros espermáticos obtidos através do Sperm Class Analys, dos espermatozoides submetidos a centrifugação com e sem amortecimento (Cushing).

Parâmetros	TRATAMENTO				
	SCA	C	C1	C2	C1-2
MÓVEIS (%)		66.4 ^a	54.5 ^{ab}	54.5 ^{ab}	42.8 ^{bc}
HIPER. (%)		24.8 ^a	13.8 ^{ab}	13.5 ^{ab}	7.8 ^{bc}
ALH (µm)		3.2 ^a	2.9 ^{ab}	2.8 ^{ab}	2.2 ^{bc}

^{abc} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0.05).



*Diferença significativa (P<0.05).

Figura 1: Taxa de recuperação espermática dos espermatozoides selecionados com e sem amortecimento durante as etapas de centrifugação.

Apresentado na I Mostra Científica de Buiatria. **ANAIS**. Anais do III Workshop em Bovinos (I Mostra Científica em Buiatria), p. 41-42, Uruguaiana-RS, abril, 2015. Disponível em: <http://media.wix.com/ugd/ab2ec2_5f8a8f2aa87c446fb50c0fb31897cfca.pdf>

APÊNDICE B

The use of cushion solution during sperm *in vitro* selection reduces oxidative stress

C.I.I.U.F. Machado, D. Missio, N.P. Folchini, K. Mattos, F.W. Santos, F.G. Leivas, D.S. Brum.
BIOTECH - Lab. Biotechnology of Reproduction, Federal University of Pampa

Keywords: cushion fluid, IVP, spermatozoa

Despite advancements and modifications on the Percoll discontinuous density gradient method for sperm selection *in vitro*, the centrifugation step in this technique is liable to cause damage to sperm cells. This process may induce the production of reactive oxygen species (ROS) and decrease antioxidant defenses. With the view to minimize the potential damage caused by the centrifugation, a cushioned technique was developed, using a colloid (cushion media) for processing the equine and porcine pre-freezing semen. However, studies using this technique for selecting bovine sperm for IVP are nonexistent. This study aimed to assess the quality of sperm through the process of sperm selection by mini-Percoll gradient modified method (Guimarães, *et al.*, Anim Reprod Sci, v.146, p.103-10, 2014), using the cushioned during centrifugation, by analyzing the production of reactive oxygen species and total antioxidant capacity. Six replicates were performed, where straws of a *Bos taurus* bull were thawed and divided into four treatment groups: Control (C) with only the Percoll discontinuous density gradient; treatment C1, which was added 150µl of cushioned media (CushionFluid® - Minitube, Tiefenbach, Germany) under the gradient in the first centrifugation; C2, with the addition of the same amount of the colloid in the second centrifugation and C1-2 with both cushioned centrifugation. After the selection process, the semen samples were designed for biochemical assays. The ROS levels were determined by a spectrofluorimetric method using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), with the results expressed in units of fluorescence (UF) (Loetchutinat *et al.*, Radiat Phys Chem, vol. 72, p. 323-31, 2005); the total antioxidant capacity was determined by reducing ferric antioxidant potential (FRAP), using a standard curve of a compound with a known antioxidant activity, and the results are expressed in µg equivalent of ascorbic acid (Benzie and Strain, Anal Biochem, v. 239, p. 70-6, 1996). The data were evaluated by ANOVA and compared with

Duncan test ($P < 0.05$). The control group showed increased production of ROS when compared to treatment with CushionFluid® (C1, C2 and C1-2) (0.352; 0.270; 0.267 and 0,258UF, respectively). The antioxidant capacity of the C2 group (44.27) was lower than the treatments C and C1 (58.6 and 58.84) and similar to C1-2 (50.4). These results suggested that sperm selection by Percoll discontinuous density gradient with CushionFluid® decreases the ROS levels whereas the sperm total antioxidant capacity was reduced in the group that cushioned method was used in the second centrifugation.

Apresentado na XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **ANAIS**. Anim. Reprod., v. 12, n. 3, p. 552, Jul/Sept. 2015.

ANEXO

Delineamento experimental do trabalho:

