

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

**INFLUÊNCIA DA FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO NA
VIABILIDADE ESPERMÁTICA E CAPACIDADE
FECUNDANTE *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DA FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO NA VIABILIDADE
ESPERMÁTICA E CAPACIDADE FECUNDANTE *IN VITRO* DE
ESPERMATOZOIDES 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: Profa. Dra. Daniela dos Santos Brum

Uruguaiana

2013

ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DA FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO NA VIABILIDADE
ESPERMÁTICA E CAPACIDADE FECUNDANTE *IN VITRO* DE
ESPERMATOZOIDES 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: Reprodução Animal

Dissertação defendida e aprovada em 26 de abril de 2013.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Francielli Weber Santos Cibin
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Lúcio Pereira Rauber
(Instituto Federal Catarinense, IFC)

Profa. Dra. Daniela dos Santos Brum
Orientadora
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, por me dar a vida e permitir chegar até aqui, colocando pessoas tão especiais no meu caminho.

À minha família que me apoiou na decisão de fazer o curso e me estimulou nos momentos de fraqueza.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniela dos Santos Brum, pela orientação, ensinamentos, pela amizade e carinho, pela paciência para passar os conhecimentos, pela grande ajuda que me deu durante todo o mestrado, o que foi determinante para a minha conclusão. Fica aqui registrado minha grande admiração, respeito e gratidão a essa pessoa maravilhosa.

Ao Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas, pelo auxílio constante em todas as atividades do meu experimento, primando sempre pela organização do setor e das atividades, demonstrando nas suas aulas, o seu grande conhecimento teórico e prático.

À Profa Dra. Francielli Cibirin, pela sua ajuda no experimento, sempre demonstrando bondade e simpatia.

Aos professores Luiz Henkes e Mário Brum, pelos ensinamentos e agradável convivência.

Ao colega Angelo Giotto, pela sua ajuda nas diversas atividades, usando do seu conhecimento prático e teórico, colaborando com paciência e dedicação.

À minha colega e amiga Cibele Gonçalves, pela sua doação ao trabalho, tanto no laboratório como na organização do mesmo, usando da sua criatividade, simpatia e solidariedade, sendo assim companhia agradável em todos os momentos.

Às colegas Pamela, Tatiane e Fernanda, que nas nossas reuniões de estudos, sempre foram amigas e solidárias.

Às alunas estagiárias Cecília, Aline e Natália, que sempre estiveram presentes em todas as etapas do experimento, dando as suas colaborações imprescindíveis ao sucesso do mesmo.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e a Unipampa, por proporcionarem essa grande oportunidade.

Aos colaboradores Progen, Alta Genetics, Frigorífico Marfrig e Frigoeste, os quais disponibilizaram materiais para os experimentos. Sem eles não seria possível a realização do mesmo e a FAPERGS pelo suporte financeiro ao projeto.

Enfim, a todas as pessoas que colaboraram e torceram por mim, meu grande agradecimento.

RESUMO

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

INFLUÊNCIA DA FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA E CAPACIDADE FECUNDANTE *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

AUTOR: ANTONIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES
ORIENTADORA: DANIELA DOS SANTOS BRUM
Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 26 de Abril de 2013.

A centrifugação por gradiente de Percoll[®] é o método mais utilizado para a seleção de sêmen bovino para a fecundação *in vitro* (FIV), no entanto, até o momento não existe nenhum estudo que indique uma força de centrifugação capaz de remover com sucesso o plasma seminal e outros constituintes, sem causar perdas na recuperação espermática ou danos funcionais aos espermatozoides obtidos no pellet. O presente estudo foi desenvolvido para verificar o efeito de diferentes forças de centrifugação na seleção espermática por gradientes de Percoll[®], através de avaliação de parâmetros de qualidade espermática e posterior desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV). Parâmetros de estresse oxidativo também foram avaliados para verificar uma possível relação com os achados na avaliação de esperma. No experimento 1, amostras de sêmen de quatro touros foram homogeneizadas e submetidas a centrifugação em gradientes descontínuo de Percoll[®] (30,60 e 90%) em diferentes forças: F1 (9000 X g), F2 (6500 X g), F3 (4500 X g) e F4 (2200 X g). No Experimento 2, as amostras de sêmen de cada touro foram processadas individualmente e centrifugadas em: F1 (9000 X g) e F4 (2200 X g). Todas as amostras espermáticas foram avaliadas quanto a concentração, motilidade, vigor, morfologia, espécies reativas de oxigênio (EROs) e integridade da membrana plasmática, sendo no experimento 2 avaliados ainda a peroxidação lipídica, defesas antioxidantes e desenvolvimento embrionário. Não foi observada diferença na concentração espermática nos sêmens submetidos a diferentes forças centrifugação. No Experimento 1, a percentagem de espermatozoides móveis foi superior ($p < 0,05$) após centrifugação em F3 e F4 e a produção de EROs de F1 foi superior ($p < 0,05$) em comparação com outras forças. No Experimento 2, quando o sêmen de cada touro foi processado individualmente, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros

de qualidade espermática, peroxidação lipídica, defesas antioxidantes, taxa de clivagem e tempo médio da primeira clivagem entre F1 e F4. No entanto, o aumento da força de centrifugação reduziu a taxa de penetração e a fertilização normal ($P < 0,05$). Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a força de centrifugação de 2200 X g aumentou a penetração e a taxa de fecundação em relação à força de centrifugação habitual (9000 X g) utilizadas na separação de espermatozoides por gradientes descontínuos Percoll[®] em bovinos. Estes resultados sugerem que esta força de centrifugação pode ser utilizada com sucesso na PIV de embriões bovinos, uma vez que não reduz a recuperação de espermatozoides e aumenta a taxa de fecundação.

Palavras-chave: Seleção de espermatozoides, gradientes de densidade, centrifugação, bovinos, fecundação *in vitro*.

ABSTRACT

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

INFLUENCE OF CENTRIFUGATION FORCE ON SPERM VIABILITY AND FERTILIZING CAPACITY OF BOVINE SPERMATOZOA

AUTHOR: ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES

ADVISOR: DANIELA DOS SANTOS BRUM

Date and Place of Defense: Uruguaiana, April 26th, 2013.

Centrifugation by Percoll® gradient is the most widely used method in the preparation of bull sperm for the purpose of *in vitro* fertilization, however at the moment, no scientific study determined the best centrifugation speed to remove seminal plasma and other constituents, i.e. the speed at which the loss of sperm cells is minimized and where the spermatozoa in the pellet still remain functional. The present study was designed to examine the efficiency of different centrifugation forces in sperm separation Percoll by methods evaluating sperm quality parameters and subsequent development and quality of bovine *in vitro* production (IVP) embryos. Additionally, we evaluated oxidative stress parameters to verify a possible relationship with the findings in the sperm evaluation. In Experiment 1, the semen samples from each bull were pooled and submitted to centrifugation in discontinuous gradients Percoll (30,60 and 90%) at different forces: F1 (9000 X g), F2 (6500 X g), F3 (4500 X g) and F4 (2200 X g). In Experiment 2, the semen samples from each bull were done separately and submitted to: F1 (9000 X g) and F4 (2200 X g). All sperm samples were evaluated to the concentration, motility, vigor, morphology, reactive oxygen species (ROS) and integrity of the plasma membrane, and in experiment 2 also were evaluated lipid peroxidation, antioxidants assays and embryo development. No difference was observed in the concentration of sperm submitted to different centrifugation forces. In Experiment 1, the total percentage of motile sperm was increased ($p < 0.05$) after centrifugation in F3 and F4 and the ROS production to F1 was superior ($p < 0.05$) compared to other forces. In Experiment 2, when the bull semen was processed individually, no significant difference was observed in the sperm quality parameters assessment, lipid peroxidation, antioxidants assays, cleavage rate

and average time of the first cleavage between F1 and F4, sires or interaction between them after Percoll. However, the increased force centrifugation reduced the rate of penetration and normal fertilization ($P < 0.05$). This work demonstrated for the first time that 2200 X g centrifugation force enhanced the penetration and fertilization rates in relation to usual centrifugation force (9000 X g) using sperm separation by discontinuous Percoll gradients in bovine. These findings suggest that this centrifugation force could be used with successful in the bovine IVP embryo since it does not reduce sperm recuperation and increases the fecundation rate.

Key-words: Spermatozoa selection; Density-gradient centrifugation, Bovine, IVF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Mecanismo de produção de EROs via espermatozoide com morfologia anormal (gota citoplasmática).....	19
Figura 2. Equilíbrio do estresse oxidativo.....	20

Artigo

Figura 1 – Average number of bovine embryo cells at 48 hours after <i>in vitro</i> fertilization with sperm of different bulls selected by Percoll.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1- Characteristics of bovine sperm (pool from four bulls) before and following centrifugation at different centrifugation forces.....	50
Tabela 2- Sperm parameters results before and after centrifugation in 9000 X g (F1) or 2200 X g (F4).....	51
Tabela 3- Total percentages of penetration and fertilization (PFT), normal penetration (NP), normal fertilization (NF), penetration and normal fertilization (PNF) and cleavage with sperm selection in Percoll by 9000 X g (F1) or 2200 X g (F4).....	52
Tabela 4- Total percentages of penetration and fertilization (PFT), penetration normal (NP), normal fertilization (NF), penetration and normal fertilization (PNF) and cleavage for different bulls.	53
Tabela 5- Reactive Oxygen Species (ROS), lipid peroxidation (TBARS), membrane integrity reaction (HOS+), glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in sperm selected by Percoll.....	54

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	13
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1- Métodos de separação espermática em bovinos.....	15
2.1.1- Gradientes descontínuos de Percoll.....	15
2.1.2- Efeito da centrifugação na célula espermática.....	16
2.2- Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide.....	18
2.3- Parâmetros para avaliação da viabilidade espermática.....	21
3- OBJETIVOS.....	26
3.1-Objetivos Gerais.....	26
3.2- Objetivos Específicos.....	26
4- ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
Abstract.....	29
1-Introduction.....	30
2- Materials and Methods.....	31
2.1- Experimental design.....	32
2.2- Statistical Analysis.....	32
2.3- Oocyte recovery and <i>in vitro</i> maturation (IVM).....	33
2.4- Sperm selection procedure.....	33
2.5- <i>In vitro</i> fertilization (IVF).....	34
2.6- <i>In vitro</i> culture (IVC).....	34
2.7- Sperm quality parameters assessment.....	35
2.7.1- Sperm motility and vigor.....	35
2.7.2- Morphology and sperm concentration.....	35
2.7.3- Membrane integrity.....	36
2.7.4- Production of ROS.....	36

2.7.5- Lipid peroxidation.....	37
2.7.6- Antioxidants assays.....	37
2.7.6.1- Non-enzymatic assay-Determination of glutathione (GSH) levels.....	37
2.7.6.2- Enzyme assay- Determination of superoxide dismutase (SOD) activity.....	38
3- Results.....	38
3.1- In Experiment 1.....	38
3.2- In Experiment 2.....	38
4- Discussion.....	40
4.1- Conclusion.....	44
5- Acknowledgements.....	44
6- References.....	44
5- CONCLUSÕES.....	56
6- PERSPECTIVAS.....	57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICE A- Reduction in force of Mini Percoll centrifugation decreases the formation of reactive oxygen species (ROS) in bovine semen.....	68
APÊNDICE B- Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação <i>in vitro</i> e desenvolvimento de embriões.....	69

1- INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos pode ser considerada uma biotécnica em desenvolvimento, embora sua aplicação atualmente seja responsável por cerca de 30% dos embriões produzidos no mundo e mais de 60% dos embriões produzidos no Brasil, que é o líder mundial no setor (Viana *et al.*, 2010). Até a década de 90, a PIVE em bovinos estava restrita a laboratórios de pesquisa, contudo, através das melhorias dos sistemas de cultivo, aprimoramento de técnicas de transporte de gametas e embriões e sistemas de *ovum pick up* (OPU), foi possível a obtenção de resultados confiáveis que permitiram sua aplicação comercial. Ao longo deste período diferentes sistemas de seleção espermática e fecundação *in vitro* (FIV) foram desenvolvidos, permitindo a utilização de sêmen de reprodutores em inúmeras raças. Contudo, apesar das evoluções, uma grande oscilação nos resultados de FIV e PIVE é observada quando utilizados diferentes reprodutores, sêmen sexado, reverso, ou diferentes partidas de mesmo touro, tornando evidente a necessidade do entendimento das alterações que ocorrem nos espermatozoides durante o processo de seleção espermática *in vitro*, para minimizar possíveis efeitos negativos.

O método de seleção espermática deve proporcionar a recuperação do maior número de células móveis e morfolologicamente normais, além de remover componentes do diluidor, plasma seminal, debris celulares e agentes infecciosos (Henkel & Schill, 2003). Embora a seleção seja fundamental para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante, ao longo do processamento espermático, altos níveis de EROs (espécies reativas de oxigênio) são formados, predispondo estas células a sofrerem danos irreversíveis, que podem causar desde a redução da motilidade até sérias consequências na formação do zigoto, clivagem e desenvolvimento embrionário (Silva *et al.*, 2007). Diversos métodos vêm sendo propostos para a seleção de espermatozoides bovinos destinados à FIV, sendo o método de gradientes de densidade descontínuos de Percoll o mais utilizado atualmente em bovinos, devido à alta recuperação espermática que proporciona em relação aos demais (Samardzija *et al.*, 2006a, Cesari *et al.*, 2006). Entretanto, o método de gradientes de Percoll inicialmente proposto por Parrish e colaboradores (1995), foi amplamente modificado, principalmente após a utilização do sêmen sexado, cuja baixa concentração e motilidade, exige métodos com alta eficiência e que proporcionem maior recuperação espermática. Entre as modificações realizadas, a força de centrifugação empregada, foi a mais expressiva, passando de 400-700 x g para até 9000 x

g, possibilitando a redução do tempo de centrifugação de 20-30 para apenas 3-5 minutos. Tais protocolos denominados de “mini Percoll” inicialmente propostos para a separação de sêmen sexado, pela rápida execução, passaram a ser empregados na FIV com sêmen sexado ou convencional (Machado *et al.*, 2009, Dell’Aqua *et al.*, 2006, Folchini *et al.*, 2012). Apesar da praticidade e alta rentabilidade produzida por estes métodos de Percoll modificados (Dell’Aqua *et al.*, 2006), a maioria das mudanças foram realizadas de forma empírica, baseadas apenas em trabalhos descritos na reprodução assistida em humanos, ou utilizando métodos de avaliação espermática pouco conclusivos.

A centrifugação pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides e conseqüentemente, influenciar nas taxas de fecundação, principalmente quando o procedimento é realizado com sêmen previamente criopreservado (Sharma *et al.*, 1997, Katkov *et al.*, 1998). Embora já se tenha comprovado os danos causados as células espermáticas pela centrifugação de sêmen equino (Len *et al.*, 2010) e canino (Rijsselaere *et al.*, 2002), aspectos qualitativos em bovinos vem sendo ignorados, sendo inexistentes estudos avaliando os danos causados as células espermáticas submetidas a protocolos que empregam altas forças de centrifugação. Este trabalho tem como objetivo determinar a influência da força de centrifugação na recuperação espermática, características morfofuncionais, formação de EROs, taxa de fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário, bem como estabelecer se existe uma correlação entre a geração de EROs e os demais parâmetros avaliados.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos de seleção espermática em bovinos

A separação espermática é um requisito fundamental para que os espermatozoides adquiram capacidade fecundante. *In vivo*, este processo ocorre naturalmente ao longo do trato reprodutivo da fêmea, seja por monta natural ou IA, onde o sêmen é depositado na vagina ou útero, respectivamente. No entanto, na FIV, é necessária a realização prévia de processos de separação espermática, visando remover o plasma seminal, separar espermatozoides móveis de células imaturas ou mortas, remover o plasma seminal, bem como debris celulares, agentes infecciosos, diluentes e crioprotetores.

Diferentes métodos tem sido propostos para separação de sêmen bovino, entre eles podemos destacar o método de migração ascendente (*swim up*), os métodos de gradientes de densidade contínuos e descontínuos, como Percoll e seus substitutivos (Samardzija *et al.*, 2006b), métodos de sucessivas lavagens através de centrifugações, e técnicas mais recentemente propostas para a espécie bovina, como o método de filtragem em coluna de gel de Sephadex[®] (Lee *et al.*, 2009) e coluna de vidro (Van der Ven *et al.*, 1988). A influência dos métodos de preparação espermática na PIVE tem sido extensivamente estudada, no intuito de se obter uma alta recuperação de células espermáticas, sem reduzir a qualidade. Embora se saiba que o método de *swim up* proporcione a recuperação de espermatozoides com melhor qualidade, Parrish e colaboradores (1995) demonstraram que com o método de Percoll é possível se obter uma taxa de recuperação espermática ao redor de 50%, que representa, uma quantidade de cinco a dez vezes maior que aquela obtida após o *swim up* (Avery & Greve, 1995). Da década de 90 até hoje, diferentes trabalhos confirmam a alta recuperação espermática obtida através da técnica de gradiente descontínuo de Percoll (Cesari *et al.*, 2006), sendo esta hoje a técnica de eleição na maioria dos laboratórios de PIV de embriões bovinos.

2.1.1 Gradientes descontínuos de Percoll

O Percoll é composto por partículas de sílica com 15 a 30nm de diâmetro, recobertas com polivinilpirrolidona, responsáveis por reduzir as propriedades tóxicas da sílica (Samardzija *et*

al., 2006a). Este composto apresenta uma grande vantagem de não penetrar em membranas biológicas, sendo usado com sucesso há décadas na seleção espermática de mamíferos, mesmo após a sua proibição em técnicas de reprodução assistida em humanos no ano de 1996, decorrente de relatos de contaminação por endotoxinas. A partir desta data, diferentes substitutivos foram lançados no mercado e vem sendo utilizados com sucesso, no entanto trabalhos realizados com sêmen bovino não demonstram incrementos, quando comparado ao Percoll (Samardzija *et al.*, 2006b).

A metodologia usual da técnica de separação por gradientes de Percoll consiste na formação de gradientes descontínuos, onde a densidade aumenta no sentido da camada superior para a inferior. A amostra de sêmen é depositada sobre os gradientes, sendo realizada a centrifugação para obtenção de um *pellet* contendo os espermatozoides selecionados. Inicialmente esta técnica preconizava a utilização de dois gradientes (90 e 45%) com um volume médio de 2mL por gradiente. Entretanto, ao longo dos anos o método de seleção por gradientes de Percoll foi amplamente modificado no que se refere ao volume e número de gradientes, assim como tempo e força de centrifugação. Alguns pesquisadores com o objetivo de produzir um desvio de sexo na produção de embriões apresentaram bons resultados com a utilização de até cinco gradientes de Percoll (Lima *et al.*, 2011). Protocolos de mini Percoll com 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). Associada a redução no volume, aumento do número de gradientes e a necessidade de alta recuperação espermática, a força de centrifugação até então utilizada de 400-700 X g foi aumentada para até 9000 X g (Dell' Aqua *et al.*, 2006; Folchini *et al.*, 2012). Com o aumento da força, protocolos cujo tempo de centrifugação variavam de 20-30 minutos, tiveram seu tempo reduzido a 3-5 minutos, tornando o procedimento extremamente rápido.

2.1.2- Efeito da centrifugação na célula espermática

A centrifugação do sêmen é utilizada rotineiramente em diferentes espécies no intuito de eliminar frações do plasma seminal e/ou concentrar amostra antes da IA ou criopreservação (Rijsselaere *et al.*, 2002), ou ainda durante as técnicas de separação espermáticas que envolvem repetidas centrifugações e ressuspensões das células espermáticas em meios de cultivo específicos. No entanto, este procedimento pode causar danos

irreversíveis aos espermatozoides e conseqüentemente, influenciar nas taxas de fecundação, principalmente quando o procedimento é realizado com sêmen previamente submetido à criopreservação (Sharma *et al.*, 1996, Katkov *et al.*, 1998). Embora exista um grande número de publicações neste sentido, os resultados sobre os danos efetivos da centrifugação a célula espermática são contraditórios. Em espécies como camundongo, ratos e humanos já foi bem estabelecido à existência de uma grande sensibilidade dos espermatozoides às forças de centrifugação, podendo as mesmas ocasionar redução da motilidade, além de danos na membrana citoplasmática e acrossoma.

Apesar de alguns estudos indicarem que espécies como bovinos e equinos apresentam uma menor sensibilidade a forças de centrifugação (Pickett *et al.*, 1975, Katkov *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 1997), nestes trabalhos as forças empregadas foram relativamente baixas quando comparadas as aplicadas atualmente (Dell' Aqua *et al.*, 2006). Oliveira *et al.* (2011) relataram aumento da descondensação da cromatina e as alterações morfométricas em espermatozoides bovino, cujo sêmen foi submetido a centrifugação em gradientes de Percoll a 500 x g por 15 minutos. Contudo, Machado e colaboradores (2009) utilizaram com sucesso a força de 5000 x g por 5 minutos para seleção de espermatozoides bovinos, não diferindo a motilidade, morfologia, integridade de membrana e acrossoma de quando utilizado uma força de 700 x g por 20 minutos. Em equinos o aumento da força de centrifugação em até 900 x g incrementou a recuperação espermática, sem ocasionar danos aos espermatozoides, quando comparado a forças de centrifugação tradicionais (300 a 600 x g). Neste mesmo estudo quando aplicado uma força de 4500 x g, ocorreu uma redução significativa na motilidade e integridade de membrana, embora tenha se obtido uma maior recuperação espermática. Um experimento avaliando quatro forças de centrifugação (180, 720, 1620 e 2880 x g) na separação de sêmen de cães, demonstrou que embora não acarretem um dano imediato, forças a partir de 1620 x g proporcionam uma redução na viabilidade espermática, após 48 horas de resfriamento a 4°C (Rijsselaere *et al.*, 2002). A centrifugação do sêmen suíno antes do congelamento a uma força de 2400 x g em suínos não afetou as características espermáticas, no entanto, neste estudo foram realizadas apenas avaliações imediatamente após o procedimento (Carvajal *et al.*, 2004). Revell *et al.* (1997) desenvolveram uma técnica de amortecimento, onde é depositado uma camada de solução isotônica de iodixanol na parte inferior do tubo, visando reduzir os danos mecânicos causados pela centrifugação. Desde então, a técnica de amortecimento tem sido utilizada com sucesso na centrifugação de sêmen

suíno para separação pré FIV ou criopreservação, permitindo o incremento da recuperação de espermatozoides, com uso de forças de até 1000 X g, sem perdas na qualidade espermática (Matás *et al.*, 2007).

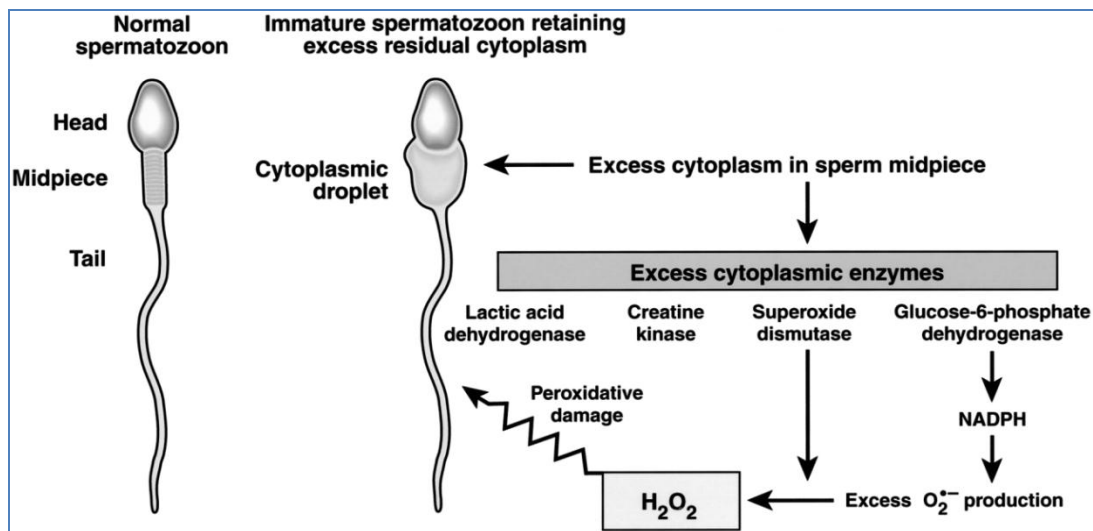
O sêmen é extremamente heterogêneo, havendo uma grande diferença entre espécie, além disso, trabalhos realizados com bovinos constataram que o sêmen de *bos indicus* apresenta uma maior sensibilidade à centrifugação em Percoll, quando comparado ao *bos taurus*, indicando que estas variações também podem ser encontradas na mesma espécie. Neste sentido, Ferrer e colaboradores (2012) sugeriram em seu trabalho que protocolos de centrifugação para sêmen equino deveriam ser adaptados para cada reprodutor.

2.2 Estresse oxidativo em células espermáticas

O estresse oxidativo (EO) seminal se desenvolve como resultado de um desequilíbrio entre geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e defesas antioxidantes (Sikka *et al.*, 1995; Sharma & Agarwal, 1996; Sikka, 2001). Espermatozoides de mamíferos são extremamente sensíveis ao dano oxidativo, devido a seu elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados e seus baixos níveis de enzimas antioxidantes (Alvarez *et al.* 1987). EROs como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^-) são subprodutos formados naturalmente do metabolismo celular aeróbico. Os antioxidantes, em geral, são compostos ou enzimas que eliminam ou inibem a formação de EROs, ou opõem-se a sua ação (Sikka *et al.*, 1995). Segundo Agarwal *et al.* (2004) os antioxidantes podem proteger as células contra o estresse oxidativo através de três mecanismos: interceptação, prevenção ou reparação. Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias principais: enzimáticos (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, e glutaciona peroxidase-GPx), e não-enzimáticos (vitamina C, vitamina E, albumina, glutaciona), entre outros (Agarwal & Prabakaran, 2005). Os espermatozoides ao longo de sua diferenciação perdem a maior parte do citoplasma, reduzindo significativamente suas defesas antioxidantes responsáveis por neutralizar as EROs e consequente peroxidação lipídica (Bucak *et al.*, 2007). O plasma seminal é dotado de um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante para proteger espermatozoides contra o EO (Sikka, 1996; Smith *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1998). Esses mecanismos atuam de forma compensatória à deficiência de enzimas citoplasmáticas em

espermatozoides (Donnelly *et al.*, 1999). O plasma seminal contém um número de antioxidantes enzimáticos tais como superóxido dismutase (SOD; Alvarez *et al.*, 1987), a glutationa peroxidase / glutationa redutase (GPX / GRD; Chaudiere *et al.*, 1984) e catalase (Jeulin *et al.*, 1989). Além disso, plasma seminal contém uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos, como albumina, vitamina C, glutationa, entre outras (Fraga *et al.*, 1991, de Lamirande e Gagnon, 1992).

As EROs tem sido atribuídas à patogênese de diversas condições que afetam praticamente todos os sistemas corporais, sendo descrita como a desencadeadora de 25% a 40% dos casos de infertilidade no homem (Padron *et al.*, 1997). Os casos de infertilidades normalmente estão associados à infiltração de leucócitos no ejaculado, visto que estas células produzem grandes quantidades de EROs (Gomez *et al.*, 1998, Whittington *et al.*, 1999), embora, os espermatozoides possam também gerar seus próprios radicais, especialmente espermatozoides imaturos (Aitken *et al.*, 2001, Saleh & Agarwal, 2002), que podem conter ainda a presença de citoplasma residual, como a gota citoplasmática, conforme ilustra a (Figura 1)

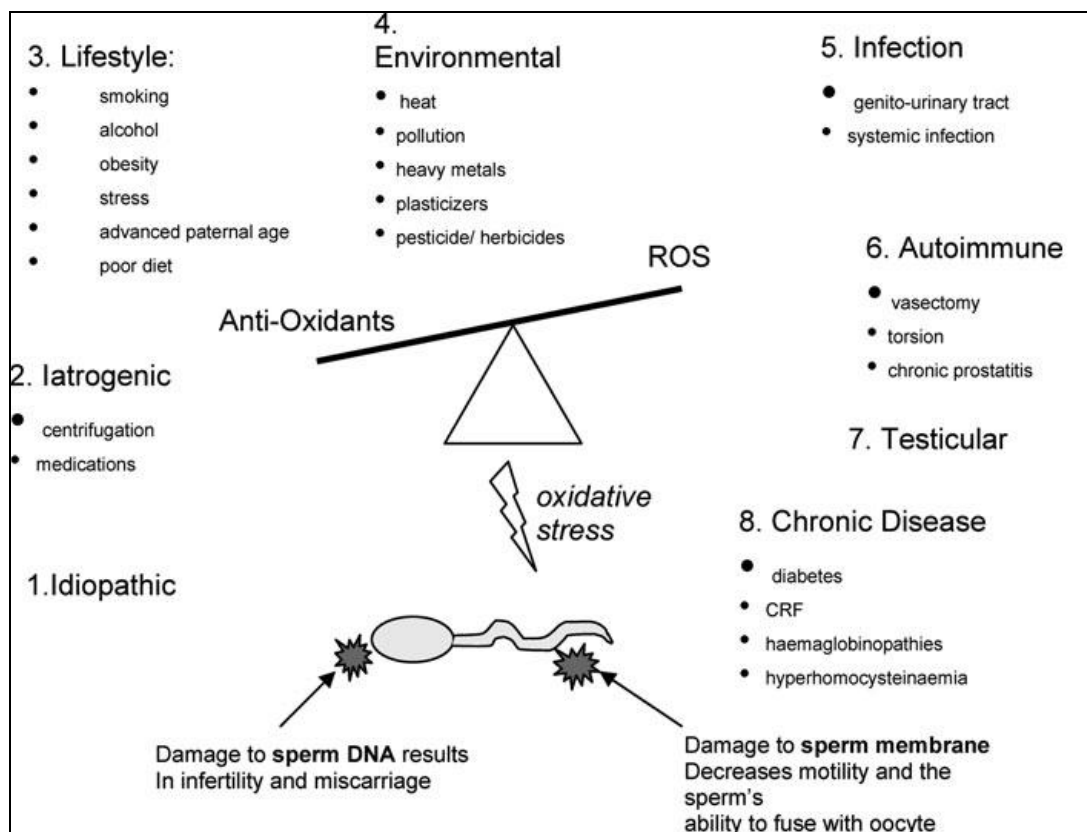


Fonte: Saleh & Agarwal, 2002

Figura 1 – Mecanismo de produção de EROs via espermatozoide com morfologia anormal (gota citoplasmática)

As EROs atacam as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, desencadeando uma peroxidação lipídica que culmina com a perda da fluidez da membrana espermática,

alterando os padrões de motilidade e capacidade fecundante (Iwasaki e Gagnon, 1992; de Lamirande e Gagnon, 1992). O aumento da permeabilidade da membrana produzido pela peroxidação lipídica proporciona o incremento de Na^+ e Ca^{2+} intracelular, esgotamento de ATP (Guthrie *et al.*, 2002) e ativação de proteases e fosfolipases que em cascata induzem o dano proteico e lipídico, que incluem inativação enzimática, alterações do DNA e eventualmente morte celular (Aitken, 1999). Desta forma, podemos verificar que os danos descritos pelo excesso de EROs à membrana espermática podem causar desde pequenas alterações na motilidade (Tvrdá *et al.*, 2011) até sérias consequências na formação do zigoto, clivagem e desenvolvimento embrionário (Silva *et al.*, 2007). No entanto, os danos causados ao DNA espermático não necessariamente afetam a fertilização, uma vez que o oócito possui mecanismos de reparo do DNA que podem permitir um maior desenvolvimento após a fertilização, mesmo com DNA do espermatozoide danificado (Matsuda *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990)



Fonte: Tremellen, 2008.

Figura 2: Estresse oxidativo causado por diferentes fatores.

Vários fatores podem desencadear o estresse oxidativo, conforme mostra a Figura 2. Entre eles os fatores iatrogênicos, ocasionados por métodos de reprodução assistida como a centrifugação realizada durante a separação espermática (Iwasaki & Gagnon, 1992, Shekarriz *et.al.*, 1995) e criopreservação (Bilodeau *et al.*, 2000).

A criopreservação de sêmen é um procedimento importante que permite vantagens específicas para a indústria pecuária (Bucak *et al.*, 2009). No entanto, durante este processo, o sêmen é exposto a choque térmico e altos níveis de oxigênio, que por sua vez aumentam a susceptibilidade a peroxidação lipídica, devido à maior produção de EROs (Bucak *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a geração de EROs no trato reprodutivo masculino tem se tornado uma preocupação real, devido aos seus potenciais efeitos tóxicos, quando em níveis elevados no sêmen (Saleeh & Agarwal 2002, Bansal *et al.*, 2011, Tvrdá., *et al.*, 2011). No entanto, 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 aos espermatozoides para adquirirem capacidade fecundante (O'Flaherty *et al.* 1999; Aitken, 1999; Ali *et al.* 2003; Funahashi, 2005). Assim, os requisitos de antioxidantes de gametas durante a fertilização parecem ser paradoxais, sendo positivo para a sobrevivência dos oócitos, mas negativo ou positivo para a fecundação, dependendo do equilíbrio entre as quantidades de EROs produzidas e eliminadas (Blondin *et al.* 1997; Ali *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2010).

2.3 Parâmetros e métodos na determinação da viabilidade espermática

A maneira mais precisa para se avaliar a fertilidade de um touro é a taxa de prenhez obtida após a monta natural, todavia, é um procedimento demorado e oneroso. Para a avaliação do sêmen criopreservado, além da taxa de prenhez, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) preconiza a análise de alguns parâmetros espermáticos como motilidade, vigor, concentração e morfologia. Entretanto, quando estas variáveis são

consideradas isoladamente, apresentam correlação muito variável com a fertilidade a campo (Rodríguez-Martinez, 2003). Diferentes parâmetros podem ser avaliados no sêmen para prever a fertilidade de um reprodutor, no entanto, é fundamental que os testes empregados para a avaliação destas características possuam objetividade, repetibilidade e exatidão (Rodríguez-Martinez, 2003) para alcançar resultados fidedignos. Contudo, a infertilidade no macho não constitui uma síndrome clínica definida, mas sim uma coleção de diferentes condições, com uma variedade de causas e prognósticos (Aitken *et al.*, 1995).

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de reprodutores, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (Verstegen *et al.*, 2002). A morfologia espermática é um importante indicador de fertilidade, além de poder ser usada para estabelecer danos espermáticos consequentes de agentes físicos ou químicos (Verstegen *et al.*, 2002; Garcia-Herreros *et al.*, 2006). Em um estudo onde 30 análises laboratoriais foram conduzidas na tentativa de prever os índices de fertilidade do sêmen bovino congelado, isoladamente, apenas a morfologia espermática pós-descongelamento apresentou correlação significativa com a taxa de concepção após inseminação artificial (Phillips *et al.*, 2004). A avaliação destes parâmetros pode ser realizada de forma subjetiva, onde um avaliador treinado realiza as leituras com auxílio de microscópio óptico ou por Sistemas Automatizados de Análise Seminal (CASA), que permitem uma mensuração objetiva de diferentes características da célula espermática, mostrando alto nível de precisão e segurança. Embora este sistema venha sendo utilizado em centrais de reprodução animal e seja bem aceito junto a comunidade científica, vários fatores podem gerar variabilidade na estimativa dos parâmetros das características dos espermatozoides mensurados pelo CASA, entre os quais podemos citar: experiência do observador, identificação da espécie, acurácia da câmara utilizada, temperatura de análise, tempo entre a colheita da amostra e sua análise, método de processamento da amostra, instrumento utilizado, concentração espermática e frequência de aquisição de imagens (Davis & Katz, 1993; Farrel *et al.*, 1996; Mortimer, 2000). Em um estudo avaliando 10 touros holandeses, Gillan e colaboradores (2008) não encontraram diferença nos resultados de motilidade entre o método subjetivo ou CASA. No entanto, independente do método utilizado, muitos estudos têm evidenciado que a avaliação do número de espermatozoides

móveis ou morfologicamente normais não é suficiente para determinar a fertilidade do espermatozoide.

A integridade da membrana plasmática é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fecundação, que incluem capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação do acrossoma e fusão dos gametas (Papa *et al.*, 2000). A avaliação da integridade da membrana pode ser realizada pelo teste hiposmótico, desenvolvido para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática, cujo princípio é submeter às células espermáticas a soluções hiposmóticas, permitindo que trocas de fluidos sejam realizadas pela membrana plasmática até que o equilíbrio osmótico seja atingido. Devido ao influxo de líquido, a membrana plasmática se expande e causa o aumento do volume da célula, especialmente na região da cauda provocando o seu enrolamento (Correa & Zavos, 1994, Rota *et al.*, 2000). No entanto, preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes, avaliadas por meio de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, gerando resultados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas (Rodriguez-Martinez, 2003). A combinação de diversas sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea das diferentes estruturas espermáticas (Arruda *et al.*, 2005). Celeghini *et al.* (2007) relataram a eficiência e a alta repetibilidade em uma técnica para avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial, utilizando uma combinação de sondas: iodeto de propídio (PI); fluoresceína isotiocianato-aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA); e 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodeto de (JC-1), respectivamente.

A combinação de vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento, avaliado por meio de baterias de testes específicos, pode explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente (Hallap *et al.*, 2004). A técnica de penetração em muco cervical ou a separação espermática por *swim-up* podem ser definidas como um teste multifuncional que avalia a capacidade espermática em transpor diferentes barreiras fluidas, semelhante ao processo que ocorre ao longo do trato reprodutor feminino, sendo que o número de espermatozoides recuperados no *swim-up* apresenta uma alta correlação com a quantidade de células viáveis presentes em uma amostra seminal (Parrish e Foote, 1987). A

inseminação artificial (IA) ou a fecundação *in vitro* (FIV) representam as técnicas de maior sensibilidade para avaliar o potencial de fecundação das amostras seminais (Crepilho *et al.*, 2009), pois permitem a avaliação simultânea dos requisitos mais importantes da célula espermática para o processo de fecundação (Rodriguez-Martinez, 2005). A técnica de FIV, tem sido sugerida para avaliação do potencial reprodutivo de touros, apresentando correlação positiva entre animais com bons índices de fecundação *in vitro* e a campo (Gilian *et al.*, 2008). Outra técnica recentemente proposta para identificar o potencial de fecundação de diferentes touros é a fecundação competitiva, onde um *pool* contendo o sêmen de dois ou mais reprodutores é utilizado para fecundar um mesmo grupo de oócitos na FIV ou fêmeas na IA (Sidel *et al.*, 2012). No entanto, o alto custo e o gasto de tempo destas avaliações, aliados à complexidade e à dependência de uma infraestrutura laboratorial (Hallap *et al.*, 2004; Rodriguez-Martinez, 2005), tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino.

O estresse oxidativo (EO) em células espermáticas tem sido apontado como uma importante causa de infertilidade em diferentes espécies (Bilodeau *et al.*, 2000), estando associado a 25 a 40% dos casos de infertilidade no homem (Padron *et al.*, 1997). Os testes podem ser diretos quando são avaliados os danos à membrana plasmática ou DNA decorrentes do estresse oxidativo ou indiretos quando é realizado a quantificação de EROs que podem desencadear um dano oxidativo. Atualmente existem mais de 30 ensaios que são utilizados para determinar o estresse oxidativo em células espermáticas (Ochsendorf, 1999). No entanto, em função do alto custo, complexidade e falta de valores padrões, testes para avaliar o estresse oxidativo não são realizados de rotineiramente (Tremellen *et al.*, 2008).

Os principais trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas contemplam a adoção de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, testes de incubação e separação espermática e análise morfofuncional por meio de sondas fluorescentes para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado (Walthers *et al.*, 2004, Crepilho, 2006, Rodriguez-Martinez, 2007, Rodriguez-Martinez & Barth, 2007). O fato sêmen ser extremamente heterogêneo, mesmo quando considerado um único indivíduo, ejaculado, ou palheta, requer que uma grande quantidade de células sejam avaliadas, a fim de se obter uma amostra significativa e reduzir o erro. Neste sentido a citometria de fluxo associada a sondas fluorescentes tem sido de grande valia, permitindo a avaliação de múltiplos parâmetros em um expressivo número de células.

A busca por parâmetros de avaliação espermática que tenham correlação positiva com a fertilidade tem sido intensa nos últimos anos, visando otimizar os resultados em programas de IA e FIV em bovinos (Rodriguez-Martinez, 2003). O teste de indução da reação do acrossoma, integridade de membrana (Rodriguez-Martinez, 2005), quantificação de EROs (Bilodeau *et al.*, 2000), marcadores moleculares de processos reprodutivos, tais como avaliação da estrutura do DNA e identificação de mRNAs dos espermatozoides, além de análise proteômica da célula (Souza *et al.*, 2011) e fluídos reprodutivos (Siciliano *et al.*, 2008) são técnicas que vem sendo descritas para avaliação espermática. No entanto, um número restrito destes testes são comumente aplicados em rotinas de FIV em bovinos, devido ao curto período de tempo para execução da técnica e baixa disponibilidade de equipamentos em laboratórios comerciais.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivos Gerais

- Buscar um método eficiente para separação espermática de sêmen bovino destinado a fecundação *in vitro*.
- Estabelecer e estudar métodos de avaliação espermática que possuam correlação com capacidade fecundante *in vitro*;

3.2- Objetivos específicos

- Verificar se a força de centrifugação durante o processo de separação espermática influencia na recuperação espermática, nas características morfofuncionais e formação de EROs;
- Determinar uma força de centrifugação que proporcione melhores características espermáticas, sem diminuir a recuperação de espermatozoides;
- Estabelecer se existe uma correlação entre as características espermáticas e formação de EROs com a capacidade fecundante *in vitro*.

4- ARTIGO CIENTÍFICO

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

ARTIGO CIENTÍFICO**REDUCTION OF CENTRIFUGATION FORCE IN DISCONTINUOUS PERCOLL
GRADIENTS INCREASES *IN VITRO* FERTILIZATION RATES WITHOUT
REDUCING SPERM RECOVERY IN BOVINE**

A.C.G. Guimarães^a, F.G. Leivas^a, F.W. Santos^a, E.B. Schwengber^a, A.B. Giotto^a,
C.I.U. Machado^a, C.G.M. Gonçalves^a, N.P. Folchini^a, D.S. Brum^{a*}

^a Federal University of Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab Biotechnology of
Reproduction, 97.500-970, Uruguaiiana, 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

The objective of this study was to determine the effect of different centrifugation forces in bovine sperm separation by discontinuous Percoll gradients to IVF. In Experiment 1, the semen samples from each bull were pooled and submitted to centrifugation in discontinuous Percoll gradients (30, 60 and 90%) at different forces: F1 (9000 X g), F2 (6500 X g), F3 (4500 X g) and F4 (2200 X g). In Experiment 2, the semen samples from each bull were done separately and submitted to F1 (9000 X g) and F4 (2200 X g). All sperm samples were evaluated to the concentration, motility, vigor, morphology, reactive oxygen species (ROS) and integrity of the plasma membrane, and in experiment 2 also were evaluated lipid peroxidation, antioxidants assays and embryo development. No difference was observed in the concentration of sperm submitted to different centrifugation forces. In Experiment 1, the total percentage of motile sperm was increased after centrifugation in F3 and F4 and the ROS production to F1 was superior compared to other forces. In Experiment 2, when the bulls semen were processed individually, no significant difference was observed in the sperm quality parameters assessment, lipid peroxidation, antioxidants assays, cleavage rate and average time of the first cleavage between F1 and F4. This work demonstrated for the first time that 2200 X g centrifugation force enhanced the penetration and fertilization rates in relation to usual centrifugation force (9000 X g) in the IVF bovine, without reducing sperm recovery in bovine.

Keywords: Sperm selection; Density-gradient centrifugation, Bovine, IVF

1. Introduction

The *in vitro* production of bovine embryos has been established in recent years, representing about 66% of embryos transferred in the world [1]. However, aspects related to *in vitro* fertilization (IVF), as variability among bulls, duration of sperm-oocyte incubation, sperm concentration used, semen matches, sex-sorted semen and protocols separating sperm are responsible for large oscillations in the production of blastocysts [2-4]. Sperm separation procedures are able to significantly improve the sperm quality enhancing progressive motility and morphological normal spermatozoa. Such selection of spermatozoa separates motile sperm, remove seminal plasma, cryoprotective agents and other background materials and debris [5]. Although the selection is fundamental for sperm fertilizing capacity, following the spermatid processing high levels of reactive oxygen species (ROS) are formed, predisposing these cells to suffer irreversible damage which could cause reduced sperm motility, serious consequences in zygote formation, cleavage and embryonic development [6]. In this way, the antioxidant defenses (enzymatic or non-enzymatic) play an important role in protecting sperm.

Centrifugation by gradient of Percoll® was the most widely used method in the preparation of bull sperm for the purpose of *in vitro* fertilization, routinely applied in commercial laboratories [7,8]. Initially, Parrish *et al.* [9] proposed Percoll protocols for separation of bovine semen, indicating 15 min centrifugation (700 X g) on a 45 and 90% discontinuous Percoll gradient to obtain optimal recovery of motility spermatozoa. However, through the years various modifications were performed, especially in the last decade with the expansion in the market for *in vitro* produced embryos and sex-sorted introduction. Among the modifications, the volume of Percoll, time and centrifugation force were the most significant [10-12]. Although all changes have been made in order to increase sperm recovery

rates and simplify the process by reducing the execution time, there are few studies evaluating the possible consequences of such changes in sperm viability and consequent production of embryos from these spermatozoa. Machado *et al.* [10] reported that decreasing Percoll volume, reducing the duration of centrifugation, and using a higher centrifugation force (5000 X g) had no negative effect on sperm quality and embryo development. However, actually most of commercial laboratories are using 9000 X g for selection all types of semen, that is the force indicated by Central of Processing semen for the sex-sorted [13].

Although there are differences among species, the centrifugation process has already been shown it may sublethal damage in the rat, mouse and human spermatozoa, independently of treatment method and consequently influence their fertilizing ability [14], especially after cryopreservation [15,16]. In bovine, despite various changes in protocols, no scientific study until now determines the best centrifugation force to remove seminal plasma and other constituents, i.e. the speed at which the loss of sperm cells is minimized and where the spermatozoa in the pellet still remain functional for IVF. The present study was designed to examine the efficiency of different centrifugation forces in Percoll sperm separation by methods evaluating sperm quality parameters and subsequent development and quality of bovine IVP embryos. Additionally, were evaluated oxidative stress parameters to verify a possible relationship with the findings in the sperm evaluation.

2. Materials and Methods

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

2.1. Experimental design

In both experiments, frozen semen from four *Bos taurus taurus* bulls was used. All samples (0.5 mL straws) from same commercial batch. Thawing was performed by immersing straws for 30 s in a 35⁰C water bath. All sperm samples were evaluated, before and after Percoll treatments, for concentration, total motility, vigor, morphology, reactive oxygen species (ROS) and integrity of the plasma membrane. In experiment 2 also were evaluated lipid peroxidation, antioxidants assays and embryo development.

In Experiment 1, (5 replicates), after thawing, the semen samples from each bull were pooled and then aliquoted in four equal fractions, one for each treatment. To determine the effects of different centrifugation forces in sperm parameters and production of ROS, the pooled semen was submitted to: F1 (9000 X g), F2 (6500 X g), F3 (4500 X g) or F4 (2200 X g).

In Experiment 2, (5 replicates), after thawing, the semen samples from each bull were done separately and then aliquoted in two equal fractions, one for each treatment, to determine effects of centrifugation force in the generation of oxidative stress and embryonic development the semen from each bull was submitted to: F1 (9000 X g) or F4 (2200 X g).

2.2. Oocyte recovery and in vitro maturation (IVM)

Bovine ovaries were collected within 4h after slaughter and transported to the laboratory in physiological saline (0.9%) with antibiotics (100 I.U. penicillin and 100 mg streptomycin/mL) at 30⁰C. *Cumulus-oocyte complexes* (COCs) were aspirated from 2 to 8mm diameter follicles using 18G needles attached to a vacuum pump. Only oocytes with

homogenous ooplasm and intact cumulus layers were selected for the further procedure. Groups of 22 COCs were IVM in 30 x 10 mm dishes (Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA 01851, USA) with in 150 µL drops of modified TCM-199 with 10% SEE (Biotech, Uruguaiana, RS, Brazil). This medium was supplemented with 5 µg/mL of porcine follicle-stimulating hormone as NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®) and 50 µg/mL of porcine pituitary luteinizing hormone LH-P (Lutropin-V®) both from Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 µg/mL of epidermal growth factor human (EGFh), 22 µg/mL of pyruvate and gentamicin. For IVM, the COCs were cultured for 24 h at 39 °C in gaseous atmosphere with 5% CO₂ with saturated humidity.

2.3. Sperm selection procedures

A Isotonic Percoll® solution was used for preparation of 90, 60 and 30% gradients with modified Talp-Fert medium [18]. The Percoll® density gradient was made by layering 300µl in 1.5mL Falcon® tubes. On the top of the gradient 200µL of thawed semen was layered and then tubes were centrifugated for 5 min in force determined according to treatment F1, F2, F3 or F4. The pellets were resuspended in the same amount of Talp-Fert media and centrifugated for 1 min at 9000 X g. Afterwards the pellets were resuspended in IVF medium and the final concentration was adjusted to 2×10^6 spermatozoa/mL.

2.4. In vitro fertilization (IVF)

After sperm procedures, samples were removed for semen analysis and then semen was used to IVF. Droplets of 150µL modified Talp-Fert medium plus 22µg/mL of pyruvate, 6

mg/mL BSA, 10 µg/mL heparin, 20 µM penicillamine/mL, 10µM hypotaurine and 2 µM/mL epinephrine/mL were prepared in 30x10mm dishes (Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA) for CCOs fertilization (Day 0) with 2×10^6 sperm cells/mL. The sperm and oocyte co-culture was performed at 39 °C with saturated humidity and gaseous atmosphere of 5% CO₂ in air. At 18 hours post-insemination, presumable zygotes were stained for 15 min (1% Hoechst 33342 in PBS), washed in PBS containing 1 mg/mL polyvinylpyrrolidone, mounted on glass slides and examined under an epifluorescence microscope at magnification (X 400) for evidence of sperm penetration and fecundation. Penetration rate and mean number of spermatozoa per penetrated oocyte were assessed for each group. An oocyte was considered as fertilized if it had two pro nuclei or a nuclei fused.

2.5. *In vitro culture (IVC)*

The *cumulus oophorus* cells were removed by successive pipeting of presumed zygotes. The IVC medium was Synthetic Oviduct Fluid (SOFaaci) with amino acid, citrate, and myo-inositol [19]. Embryos were transferred individually to the microwells of a well of the well (WOW) culture dish (Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary) and cultured in groups, under mineral oil at 39°C, saturated humidity and gaseous atmosphere of 5% CO₂ in air for 2 days, on the stages of compact digital inverted microscopes designed to be used inside of the incubator, exhibiting automated time-lapse analysis (Primo Vision time-lapse embryo monitoring system, Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary). Image capture frequency was set to 5 min. The embryos were individually evaluated on day 2 for cleavage and number of cells. It was recorded the elapsed time up to the first cleavage.

2.6. Sperm quality parameters assessment

2.6.1. Sperm motility and vigor

The sperm motility and vigor were subjectively assessed immediately after thawing and after each treatment by preparing wet sperm mounts. Estimation of progressive motile cells percentage was performed at magnification (X 100). The evaluations were performed by the same observer.

2.6.2. Morphology and sperm concentration

In order to assess the morphology of the spermatozoa, a 10 μ l aliquot of fixed sperm suspension was placed on a microscope slide, overlaid with a coverslip and permitted to settle in a humidified chamber for 2 min. A total of 200 spermatozoa were assessed and the proportion of abnormal forms in each sample was determined using phase-contrast microscopy (X 1000) based on a method described by Barth and Oko [20]. For concentration the semen samples were diluted (1:10) in 90 μ l formaldehyde solution. Counting was done in a Neubauer chamber hematimetric improved the microscope with 400 times magnification. Spermatozoa were counted present in 10 of the 25 squares 0.04 mm² (volume = 0.004 mm³, since the height is 0.1 mm). The results were converted to concentration in sperm per mL, multiplying the number of sperm counted in five squares per 0.5×10^6 .

2.6.3. Membrane integrity

The functional integrity of bovine sperm membrane was determined by hypoosmotic swelling test (HOS) as described by Lomeo and Giambierso [21]. The assay was performed mixing 10 μ L of semen with 50 μ L of hypoosmotic solution (100mosm) and incubating at 37⁰C for 45 min. A total of 100 cells were evaluated in at least five different fields under magnification (X 400). Spermatozoa with changes were denoted as swelled or HOS positive (HOS+).

2.6.4. Production of ROS

ROS levels were measured by a spectrofluorimetric method [22] incubating the sperm in Tris-HCl in the presence of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at 37⁰C. 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 turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of intracellular ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520nm (with 480 nm excitation) using a spectrofluorometer Shimadzu (Japan) model RF5301PC. ROS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

2.6.5. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was performed by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction as previously described by Ohkawa, *et al.* [23]. An aliquot of spermatozoa was incubated at 95 °C for 2 h. The absorbance was read

at 532 nm using a Hidex Plate Chameleon V Multitechnology Platereader – Model 425-156 and the data expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mL.

2.6.6. Antioxidants Assays

2.6.6.1. Non-enzymatic assay - Determination of glutathione (GSH) levels

GSH levels were determined by spectrofluorimetric method in accordance with Hissin and Hilf [24] using o-phthalaldehyde (OPA) as fluorophore sperm (10 µl) was incubated with 10 µl of OPA (0.1% in methanol) and 180 µl of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in dark. Fluorescence was measured with a Hidex Plate Chameleon V Multitechnology Platereader – Model 425-156 at excitation wavelength of 350 nm and at emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol GSH/mL.

2.6.6.2. Enzyme assay - Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase activity was measured as described by Misra and Fridovich [25]. This method is based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome. The colour reaction can be monitored at 480 nm. One enzymatic unit (1 IU) is defined as the amount of enzyme necessary to inhibit the auto-oxidation rate in 50% at 26°C.

2.7. Statistical Analysis

The effects of force, sire, and their interaction on sperm characteristics and sperm penetration were analyzed by GLM procedure and the means comparable by Tukey's test. Cleavage rates in experiment 2 were analyzed by chi-square. All statistical analyses were done with SAS/IML software release 8.2 [17], with $P < 0.05$ considered significant. In the antioxidant assays as well as lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) levels, data were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Experiment 1- Effects of different centrifugation forces in sperm parameters and production of ROS.

Centrifugation on discontinuous Percoll gradients 30/60/90 reduced sperm concentration compared to before Percoll ($P < 0.05$) whereas no difference was observed in the sperm concentration submitted to different centrifugation forces. However, centrifugation was not effective in reducing the sperm number with abnormal morphology or increasing the HOS + (Table 1). The total percentage of motile sperm was increased ($P < 0.05$) after centrifugation in F3 and F4 compared to before Percoll and F1. The vigor was superior in F3 and F4 compared to before Percoll. ROS levels were higher in sperm submitted to F1 than other forces evaluated ($P < 0.05$).

3.2. Experiment 2- Effects of centrifugation force in the generation of oxidative stress and embryonic development.

Comparing the results of sperm concentration before processing ($78.70 \pm 10.10 \times 10^6$ spz/mL) with the results after Percoll ($36.42 \pm 9.10 \times 10^6$ spz/mL) it was found out that there were significant differences ($P < 0.05$) between them. However, no significant difference was observed between F1 and F4 and sires or interaction between them after Percoll. The total percentage of motile sperm, vigor and abnormal morphology after Percoll were $72.50 \pm 13.15\%$, 3.90 ± 0.82 and $10.77 \pm 2.59\%$, respectively. No significant difference was observed between F1 and F4 and sires or interaction between them after Percoll. However, significant differences were observed regarding Percoll after and before treatment, resulting in the reduction of abnormal morphology and improved vigor after centrifugation. The improved motility was only for F1 (Table 2).

The membrane integrity test results after the processing was $44.10 \pm 10.70\%$, there was no significant interaction between centrifugation force and sires after Percoll. However, the bulls 2 and 4 presented an increase in HOS + when compared to bulls 1 and 3 (Table 5). The sperm penetration rate and fecundation after Percoll gradients were similar ($P > 0.05$) for all treatments. There was no significant interaction between centrifugation force and sires whereas, there were significant differences between force and bulls (Table 3 and 4, respectively).

No difference in the cleavage rate was found among force (Table 3), bulls (Table 4), or interactions between them. Additionally, in the average time of the first cleavage (31.73 hours after fecundation) was similar between bulls and forces. Centrifugation force did not cause a significant alteration on the ROS production, however ROS levels were increased ($P < 0.05$)

for bull sperm 4 when compared to bull 1, bull 2 and bull 3 (Table 5). GSH levels were reduced in bulls sperm 2 and 4 whereas SOD activity was increased in bull sperm 1. It was not observed difference in the lipid peroxidation levels among bulls sperm.

4. Discussion

The sperm separation technique to IVF procedure should improve sperm quality characteristics and remove seminal plasma, dead spermatozoa and other cells, including leukocytes and bacteria [26]. Many sperm separation techniques have been developed with this objective, being Percoll discontinuous gradients the applied routinely for sperm preparation in the IVF laboratories bovine, due to higher motility and number of insemination doses produced with this technique [7,10]. Concerning concentration and percentage of sperm with intact plasma membrane after preparation, our results are in agreement with previous work that showed that density-gradient centrifugation preparation results in higher HOS+ and sperm concentration [7]. However, we have shown that the motility was not always incremented after the procedure Percoll, at first glance, this observation conflicts with previous reports [8,10], but the variation of the centrifugation force and processing bulls semen (pool versus individual) used in our experiments must be considered. In relation to sperm morphology, there is strong evidence suggesting that Percoll gradient centrifugation reduces the percentage of morphological alterations in semen from different species [16,27]. Under our experimental conditions only in experiment 2 was able to induce a significant reduction in the abnormal morphology. This is probably related to the high variability that could be present in some bulls and differences in the Percoll density procedures.

Several studies have been published proposing modifications for improved results of Percoll discontinuous gradients, among these proposed modifications, a lower volume of Percoll and centrifugation at a greater force and time of centrifugation [10,12]. Machado *et al.* [10] using a higher centrifugation force had no negative effect on sperm quality, embryo development, or sex ratio, however, in this study, force was tested only until 5000 X g. In the present study, the control force used was 9000 X g, as suggested currently protocols for sexed semen used in commercial laboratories of bovine IVF [11,12,13]. The force applied to the centrifugation technique Percoll in Experiment 1 produced significant differences in sperm characteristics and production of ROS, suggesting that the reduction in force of centrifugation could increase the parameters as motility and vigor, without interfering with sperm recuperation. However, in Experiment 2, where the semen of bulls was processed individually, in different forces, there was no difference among them, indicating a likely compensatory effect among sperm from different bulls, when they worked as *pool*. In experiment 2, although there have not been differences among forces in sperm parameters as in Experiment 1, but, the rate of penetration and normal fertilization was higher for the reduced centrifugation force (Force 4). However, this force has not been superior in cleavage rate, on time to the first cleavage or average number of cells at 48 hours.

Variation on results among bulls observed in this study has been well documented for both sperm characteristics, fertilization and embryonic development rates [28-30], and it is currently the main obstacle to success in the commercial IVF [10,31-32]. Among the factors responsible for infertility in males, oxidative stress has been implicated as one of the most important, causing sperm abnormalities via induction of lipid peroxidation (LPO). Although it is known that ROS may be responsible for lipid peroxidation of the plasma membrane, causing alteration in permeability, inactivation of enzymes and even cell death, they are

essential to basic mechanisms required for fertilization. Recent studies demonstrate that high concentrations of ROS to sperm can cause the formation of embryos with reduced competence for developing to the blastocyst stage [33]. Bovine sperm under aerobic conditions are extremely sensitive to oxidative damage because of their high polyunsaturated fatty acid content and to their relatively low antioxidant enzyme levels. When manipulated *in vitro*, during assisted reproductive techniques, these cells take the risk of generating and being exposed to supra-physiological level of ROS [34]. In the current study, the bull 4 produced a larger amount of ROS, when compared to the others. Although an increase in the seminal ROS level has been reported in 40% of the infertile men [35], our results showed no evidence that these damage were caused to the plasma membrane, since there was no evidence of lipid peroxidation, with levels of MDA and HOS⁺ similarly with other bulls. Silva *et al.* [6] reported that the impact of oxidative stress to sperm becomes primarily shown after the first cleavage of the formed zygote, however, in this experiment, the semen of the bull 4, which amount of ROS formed, showed a higher average number of cells at 48 hours after IVF, again cooperating with the hypothesis that the higher values of ROS would be acting on a beneficial way in this case.

Seminal plasma (SP) contains abundant antioxidants [36,37], and evidence suggest that, as long as spermatozoa are suspended in SP, they are protected from oxidative damage. However, after Percoll centrifugation, the spermatozoa have little capacity for reparation oxidative damage because their cytoplasm contains low concentrations of scavenging enzymes [38]. The SOD activity and intracellular concentration of GSH are two major antioxidants in bovine spermatozoa [38,39]. However, cryopreservation significantly reduce sperm GSH levels by 78% and SOD activity by 50% [38]. Bulls have the lowest SOD activity per spermatozoa by at least fourfold when compared to that of boar, ram, stallion, and donkey

[40]. Studies in infertile males observed that the increase in SOD activity represents an attempt to overcome the ROS insult [41]. In this study the bull 1, the SOD level was high, had a lower rate of normal penetration. However, the high production of ROS reported in this study in the Bull 4, have not showed elevation in SOD activity. Studies the addition of GSH during fertilization or GSH treatment of bovine sperm, show enhanced embryo production, but no effect on embryo quality [42,43]. On the contrary, a recent study suggest that supplementation with antioxidants during IVF reduces sperm quality, normal pronuclear formation and embryonic development [44]. In this study, the bulls 1 and 4, whose fertilization rate and average cell for 48 hours showed significant differences, having the highest concentrations of GSH, demonstrating a variation between bulls also reported by other authors [45]. However, mechanisms in the oocyte can repair the oxidation of sperm [6], could justify these differences.

Laboratory *in vitro* production of embryos are sometimes confronted with the need to use semen from of fertile bulls of high genetic merit that for reasons of age, sex-sorted or incidents during their active life show a lower semen quality than previously. Besides these factors, it is known that the semen is highly heterogeneous even within a single ejaculate and the methods of separation should be less aggressive as possible in order to be applicable with positive outcome to a greater number of bulls. Our results shown that a force of 2200 X g is enough to separate bovine sperm successfully to IVF. Studies performed in other species, have demonstrated that the centrifugation process may produce sublethal to damage spermatozoa cells [14]. Future studies are needed to verify whether the differences in results regarding rate of penetration following Percoll centrifugation this work, are a consequence of different centrifugation forces used.

4.1. Conclusions

The centrifugation forces used in this work for sperm separation by discontinuous Percoll gradients had not effect on sperm quality parameters and ROS production when the bull semen is processed individually. Additionally, it increased force centrifugation and reduce the rate of penetration and normal fertilization. However, high centrifugation forces increases the production of ROS and reduces sperm quality parameters such as vigor and motility when worked as a pool. This work demonstrated for the first time that 2200 X g centrifugation force enhanced penetration and fertilization (PFT), normal penetration (NP) as well as penetration and normal fertilization (PNF) rates in relation to usual centrifugation force (9000 X g) using sperm separation by discontinuous Percoll gradients in bovine. These findings suggest that this centrifugation force could be used with successful in the IVP bovine embryo since it does not reduce sperm recuperation and increases the fecundation rate.

Acknowledgments

CNPq (501763/2009-0) and FAPERGS (1011575) for financial support. Progen, Alta Genetics, Marfrig Group and Frigoeste for providing the semen and ovaries.

References

- [1] Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo LSA. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae* 2010; 38:661-76.
- [2] Avery B, Greve T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in insemination. *Theriogenology* 1995; 44:871-8.

- [3] Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 2002; 57:2105-17.
- [4] Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction* 2012; 9:153-65.
- [5] Zavos PM. Preparation of human frozen –thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertil Steril* 1992; 57:1326-30.
- [6] Silva, PFN, Gadella, BM, Colenbrander, B, Roelen, BA. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology* 2007; 67:609-19.
- [7] Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production. *Theriogenology* 2006; 66:1185-1193.
- [8] Lee HL, Kim SH, Ji DB, Kim YJ. A comparative study of Sephadex. Glass wool and Percoll™ separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci* 2009; 10:249–55.
- [9] 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; 44:859-69.
- [10] Machado GM, Carvalho, JO, Siqueira Filho, E, Caixeta, ES, Franco MM, Rumpf, R, et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009; 71:1289-97.

- [11] Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, et al. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* 2011; 75: 429-433.
- [12] Folchini NP, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Martin DM, Spiazzi CC, et al. Use of Mini Percoll modified for selection and reduction of the formation of reactive oxygen species (ROS) on bull sperm [in Portuguese]. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2012; 36:239-44.
- [13] Dell' Aqua Jr A, Papa FO, Araújo Jr JP, Freitas CP, Ponchirolli CB, Figueiredo AS, et al. Application of sexed sorted semen in embryo production [in Portuguese]. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34:205-212.
- [14] Sharma RK, Vemulapalli S, Kohn S, Agarwal A. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. *Arch Androl* 1997; 8:33-39.
- [15] Katkov, II, Mazur, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield cell associations of mouse spermatozoa. *J Androl* 1998; 19:232-41.
- [16] 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.
- [17] SAS Institute Inc., SAS/IML® Software: Changes and Enhancements, Release 8.2, Cary, NC:SAS Institute Inc., 2001.
- [18] Parrish JJ, Suskho-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.
- [19] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callensen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with

sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology* 1999; 52:683-700.

[20] Barth AD, Oko RJ. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1 st ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.

[21] Lomeo AM, Giambero AM. Water-test^o: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl*, 1991; 14:278-82.

[22] Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J.P, 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 *Radiat. Phys. Chem* 2005; 72:323-31.

[23] Ohkawa H, Ohishi, N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-58.

[24] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74:214-226.

[25] Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-75.

[26] Henkel, R.R.; Schill, WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:1-22, 2003.

[27] Oliveira LZ, Lima VFHM, Levenhagen MA, Santos RM, Assumpção TI, Jacomini JO, et al.. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. *J Vet Sci* 2011; 2: 267-72.

[28] Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. 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*. 2001; 60:47-55.

- [29] Rehman N, Collins AR, Suh TK, Wright Jr RW. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1994; 41:1447–52.
- [30] Sumantri C, Boediono A, Ooe M, Saha S, Suzuki T. Fertility of sperm from a tetraparental Chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 1997; 46:35–45.
- [31] Balić IM, Milinković-Tur S, Samardžija M, Vince S. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. *Theriogenology* 2012; 78:423-31.
- [32] Ward F, Rizos M, Boland P, Lonergan P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 2003; 59:1575–84.
- [33] Hendricks K, Hansen PJ. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. *Aust Vet J* 2010; 88: 307:10.
- [34] du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obst Gynecol* 2008; 3:539-554.
- [35] Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry* 2011; 4:319-24.
- [36] Kefer, J C, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol* 2009; 16:449-57.
- [37] Makker K, Agarwal A, Sharma RK. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129:357-67.

- [38] Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard, MA, Gagnon, C. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Rep Dev* 2000; 55:282-8.
- [39] Beconi MT, Affranchino MA, Schang LM, Beorlegui NB. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochem Int* 1991; 23:545-53.
- [40] Menella MR, Jones R. Proprieties of spermatozoa superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ioncatalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem J* 1980; 191:289-297.
- [41] Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* 2002; 48:186-189.
- [42] Earl CR, Kelly J, Rowe J, Armstrong DT. Glutathione treatment of bovine sperm enhances *in vitro* blastocyst production rates [Abstract]. *Theriogenology* 1997; 47: 255.
- [43] Van Soom A, Vanroose G, de Kruif A. Glutathione addition during fertilization doubles embryo production but has no effect upon embryo quality in cattle [Abstract]. *Theriogenology* 1998; 49:301.
- [44] Gonçalves F, Barreto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingot GZ. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Dom Anim* 2010; 45:129-35.
- [45] Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi AL, Hendriksen PJ, Bevers MM. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999; 52:537-47.

TABLE 1- Characteristics of bovine sperm (pool from four bulls) before and following centrifugation at different centrifugation forces.

Semen characteristics	Before	After Percoll			
	Percoll	F1	F2	F3	F4
HOS+ (%)	36.6 ±4.34	34,4±5.72	34.0±5.39	43.4 ±6.15	39.0±4.30
Concentration (x10 ⁶)	91.5 ^a ± 2.37	15.6 ^b ±2.71	16.4 ^b ± 3.67	21.8 ^b ± 7.07	18.6 ^b ± 3.96
Motility (%)	64.0 ^b ± 5.48	67.0 ^b ±6,71	71.0 ^{ab} ±7.42	85.0 ^a ±8.66	83.0 ^a ± 8.37
Vigor (1-5)	3,0 ^b ±0,0	3.4 ^{ab} ±0.55	3.4 ^{ab} ±0.55	4.0 ^a ±0.0	3.8 ^a ±0.55
Abnormal morphology (%)	23,50 ±5.41	25.16 ±12.6	23.5±7.26	20.16 ±4.80	22.5 ±2.25
Formation ROS (UF)	ND	61.03±1.816 ^a	44.19±9.18 ^b	41.54±11.12 ^b	46.06±10.13 ^b

Data are expressed as mean±SD. Within a row, means without a common letter differed (P < 0.05).

F1: 9000 X g; F2:6600 X g; F3: 4500 X g; F4: 2200 X g.

ROS: Reactive Oxygen Species expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

HOS+: Membrane integrity reaction positive

ND – non determined

TABLE 2- Sperm parameters results before and after centrifugation in 9000 X g (F1) or 2200 X g (F4).

Force	Motility (%)	Abnormal Morphology (%)	Vigor	HOS+ (%)
Before Percoll	65 ± 7.59 ^b	15.90 ± 4.30 ^b	3.30 ± 0.57 ^b	32.9 ± 10.19 ^a
After F1	75 ± 11.92 ^a	10.16 ± 5.44 ^a	4.01 ± 0.75 ^a	42.6 ± 9.36 ^b
After F4	70 ± 14.14 ^{ab}	11.37 ± 4.82 ^a	3.80 ± 0.89 ^a	45.6 ± 12.11 ^b

Data are expressed as mean±SD.

Within a column, means without a common letter differed (P < 0.05).

HOS+: Membrane integrity reaction positive.

TABLE 3- Total percentages of penetration and fertilization (PFT), normal penetration (NP), normal fertilization (NF), penetration and normal fertilization (PNF) and cleavage with sperm selection in Percoll by 9000 X g (F1) or 2200 X g (F4).

Force	Oocytes evaluated	(PFT)*		(NP)*		(NF)*		PNF		Cleavage	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
F1	324	242	75 ^a	60	19 ^a	143	44 ^a	203	63 ^a	40/46	87 ^a
F4	354	292	83 ^b	89	25 ^b	152	43 ^a	241	68 ^b	34/44	77 ^a

^{ab} Within a column, means without a common letter differed ($P < 0.05$).

* Percentage based on total of evaluated oocytes

TABLE 4- Total percentages of penetration and fertilization (PFT), penetration normal (NP), normal fertilization (NF), penetration and normal fertilization (PNF) and cleavage for different bulls.

	Oocytes evaluated	(PFT)*		(NP)*		(NF)*		PNF		Cleavage	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Bull 1	172	108	63 ^b	57	33 ^a	45	26 ^b	61	59 ^b	18/23	78
Bull 2	155	124	80 ^{ab}	30	19 ^b	75	48 ^{ab}	41	68 ^b	19/23	83
Bull 3	179	150	84 ^a	25	14 ^b	75	42 ^{ab}	44	56 ^b	19/22	86
Bull 4	172	152	88 ^a	37	22 ^b	100	58 ^a	48	80 ^a	18/22	82

Within a column, means without a common letter differed ($P < 0.05$).

* Percentage based on total of evaluated oocytes

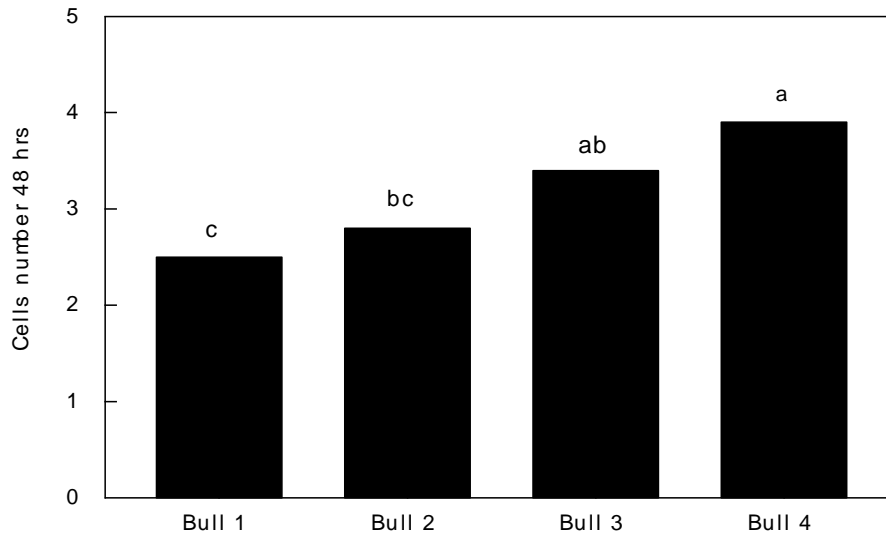
TABLE 5 - Reactive Oxygen Species (ROS), lipid peroxidation (TBARS), membrane integrity reaction (HOS+), glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in sperm selected by Percoll.

Bull	ROS UF	TBARS mM	HOS+(%)	GSH mM	SOD IU
Bull 1	55.28 ± 11.54 ^a	0,25±0,025	35.20 ± 7.02 ^b	31,77±2,74 ^a	9,72±2,50 ^a
Bull 2	63.78 ± 8.54 ^a	0,25±0,024	49.20 ± 7.20 ^a	27,27±3,82 ^b	6,79±1,12 ^b
Bull 3	59.68 ± 12.22 ^a	0,26±0,050	37.20 ± 6.62 ^b	33,45±2,75 ^a	6,58±1,64 ^b
Bull 4	76.01 ± 4.43 ^b	0,24±0,016	54.80 ± 7.89 ^a	27,97±1,03 ^b	7,45±1,35 ^b

Within a column, means without a common letter differed ($P < 0.05$).

Data are expressed as mean±SD.

ROS: expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).



a,b,c: Bars with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$).

FIG. 1- Average number of bovine embryo cells at 48 hours after *in vitro* fertilization with sperm of different bulls selected by Percoll.

5- CONCLUSÕES

- As altas forças de centrifugação (9000 X g) não influenciaram a recuperação espermática, contudo, foram responsáveis pela redução na motilidade e aumento na produção de EROs por células espermáticas, quando o sêmen foi processados em pool.
- As forças de centrifugação utilizadas não afetaram a recuperação espermática, assim como os parâmetros morfofuncionais e a produção de EROs no sêmen, quando as amostras foram processados individualmente.
- Não se verificou danos oxidativo em relação à força empregada, no entanto, uma variação individual entre touros na produção de EROs e defesas antioxidantes foi verificada.
- A força de 2200 X g incrementou os índices fecundação, no entanto não teve efeito no desenvolvimento embrionário até 48 horas.
- Foi demonstrado que a força de 2200 X g é eficiente para a seleção de espermatozoides por centrifugação em gradientes descontínuos de Percoll, pois incrementa as taxas de fecundação *in vitro*, sem reduzir a recuperação espermática.

6- PERSPECTIVAS

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

- Avaliar um maior número de embriões até 48 horas e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, para verificar se efeito da redução da taxa de fecundação até 18 horas não poderia influenciar a quantidade e qualidade embrionária.
- Desenvolver estudos comparativos entre amostras de sêmen processadas individualmente ou em pool, visando o entendimento de possíveis efeitos compensatórios.
- Comparar as forças de centrifugação deste trabalho com forças bastante utilizadas na literatura (400-700 X g).
- Testar as forças de centrifugação utilizadas neste trabalho em sêmen sexado e reverso, com objetivo de estabelecer se o protocolo sugerido em nosso estudo pode ser aplicado para qualquer tipo de sêmen utilizado na FIV.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., NALLELLA, K. P., ALLAMANENI, S. S., SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive Biomedicine Online**, v.8, p.616–627, 2004.

AGARWAL, A., PRABAKARAN, S. A.: Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43, p.963-974, 2005.

AITKEN R.J. Free radicals, lipid peroxidation, sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

AITKEN, R.J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p.1-7, 1999.

AITKEN, R.J, KRAUS, Z.C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497–506, 2001.

ALI, A.A., BILODEAU, J.F., SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p. 939-949, 2003.

ALVAREZ, J.G., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO L., STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v.8, p.336-348, 1987.

ARMSTRONG JS, RAJASEKARAN M, HELLSTROM WJ, SIKKA SC. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.19, p.412-419. 1998

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., SOUZA, L.W.O., NASCIMENTO, J., ANDRADE, A.F.C., RAPHAEL, C.F., GARCIA, A.R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Science Veterinary**, v.33, p.145-150, 2005.

AVERY, B., GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in insemination **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995.

BALIĆ, I.M., MILINKOVIĆ-TUR, S., SAMARDŽIJA, M., VINCE, S. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology**, v.78, p.423-31. 2012.

BANSAL, A. K., BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions . **Veterinary Medicine International**, p.1-7, 2011.

BILODEAU J.F., CHATTERJEE S., SIRARD M.A., GAGNON C. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction of Development**, v.55, p. 282-288, 2000.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRAD, M-A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v.18, n.4, p.454-460, 1997.

BUCAK, M.N., ATES, A., AHIN, S., VARISLI, O., YUCE, A., TEKIN, N., AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p.1060-1067, 2007.

BUCAK, M.N., ATES, A., AHIN, S., YUCE, A. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128-134, 2008.

BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., SARIÖZKAN, S., ULUTAS, P. A. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 13-17, 2009.

CARVAJAL G, CUELLO, C., RUIZ, M., VÁZQUEZ, J.M., MARTÍNEZ, E.A., ROCA J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**, v.25, p.389-396, 2004.

CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F.C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

CESARI, A., KAISER, G.G., MUCCI, N., MUTTO A., VINCENTI, A., FORNÉS, M.W., ALBERIO R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production *in vitro*. **Theriogenolog**, v.66, p.1185–1193, 2006.

CHAUDIERE, J., WILHELMSSEN, E.C., TAPPEL, A.L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. **Journal Biology Chemistry**, v.259, p.1043-1050, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 65p, 1998.

CORREA, J.R. & ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.

CRESPILHO, A. M., PAPA, F. O., ALBERT, K. I., SIQUEIRA FILHO, E. R., MARTINS, A., NOVAES, J. L. C., DELL'AQUA, J. A. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinaria**, v. 22, p. 229-235, 2006.

de LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p.379–386,1992.

DELL'AQUA, J.R.A., PAPA, F.O., ARAÚJO, J.R.J.P., FREITAS, C.P., PONCHIROLI, C.B., FIGUEIREDO, A.S., MELO, C. M., ALBERTI, K., CRESPILHO, A. M., SIQUEIRA FILHO, E. R., ORLANDI, C. A. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. Application of sexed sorted semen in embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.205-212, 2006.

DONNELLY, E.T., MCCLURE, N., LEWIS, S. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.72, p.484-495, 1999.

FARREL, P.B., FOOTE, R.H., MCARDLE, M.M., TROUERN-TREND, V., TARDIF A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FERRER, M.S., LYLE, S.K., EILTS, B.E., ELJARRAH, A.H., PACCAMONTI, D.L. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. **Theriogenology**, v.78, p.1814–1823, 2012.

FOLCHINI, N.P., LEIVAS, F.G., SANTOS, F.W., SCHWENGBER, E.B., MARTIN, D.M., SPIAZZI, C.C., BRUM, D.S. 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.

FRAGA, G.G., MOTCHNIK, P.A., SHIGENAGA, M.K., HELBROCK, J.H., JACOB, R.A., AMES, B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.11003-11006, 1991.

FUNAHASHI, H. & SANO, T: Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. **Theriogenology**, v.6, p.1605-1616, 2005.

GARCIA-HERREROS, M., APARICIO, I.M., BARON, F.J., GARCIA MARTIN, L.J., GIL, M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **International of Journal Andrology**, v.29, p.553-563, 2006.

GILLAN, L., KROETSCH, T., MAXWELL, W.M.C., EVANS, G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.201-214, 2008.

GOMEZ, E., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International of Journal Andrology**, v.94, p.21-28, 1998.

GONÇALVES, F., BARRETO, L.S.S., ARRUDA, R.P., PERRI, S.H.V., MINGOT, G.Z. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.129-135, 2010

GUTHRIE, H.D., LIU, J., CRITSER, J.K. Osmotic Tolerance Limits and Effects of Cryoprotectants on Motility of Bovine Spermatozoa. **Biology of reproduction**, v.67, p.1811-1816, 2002

HALLAP, T., HAARD, M., JAAKMA, U., LARSSON, B., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v.62, p.702-713, 2004.

HENDRICKS, K. & HANSEN, P.J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. **Australian Veterinary Journal**, v.88, p.307-310, 2010.

HENKEL, R.R. & SCHILL, W-B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-22, 2003.

IWASAKI, A. & GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v.57, p.409-416, 1992.

JEULIN, C., SOUFIR, J.C., WEBER, P., LAVAL-MARTIN, D., CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, p.185-196, 1989.

KATKOV, I.I., MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield cell associations of mouse spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, p.232-41, 1998.

KATKOV, I.I., OSTASHKO, F.I. Correlation between electromechanical stability of cytoplasmic membranes and cryoresistivity of bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v.5, p.28-31. 1996.

LEE, H.L., KIM, S.H., JI, D.B. KIM, Y.J. A comparative study of Sephadex. Glass wool and Percoll™ separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v.10, p.249–255, 2009.

LEN, J.A., JENKINS, J.A., EILTS, B.E., PACCAMONTI, D.L., LYLE, S.K., HOSGOOD, G. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology**, v. 73, p.225-231, 2010.

OLIVEIRA, L.Z., LIMA, V.F.M.H., LEVENHAGEN, M.A., SANTOS, R.M, ASSUMPCÃO, T.I., JACOMINI, J.O., ANDRADE, A.F.C., ARRUDA, R.P., BELETTI, M.E. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Journal of Veterinary Science**, v.12, p. 67-272, 2011.

LEIVAS, F.G., BRUM, D.S., FIALHO, S.S., SALIBA W.P., ALVIM, M.T.T, BERNARDI ML, RUBIM, M.I.B., SILVA, C.A.M. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v.75, p.429-433, 2011

LEN, J.A., JENKINS, J.A., EILTS, B.E., PACCAMONTI, D.L., LYLE, S.K., HOSGOOD, G. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology**, v. 73, p.225-231, 2010.

LIMA, V.F.M.H, MOREIRA-FILHO, C.A., LUCIO, A.C., RESENDE, M.V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1680-1685, 2011.

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

MATÁS, C., DECUADRO, G., MARTÍNEZ-MIRÓ, S., GADEA, J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. **Theriogenology**, v.67, p.1087-1091, 2007.

MATSUDA, Y., TOBARI, I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. **Mutation Research**, v.47, p.210-235, 1989.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.5, p.399-420, 1999

O'FLAHERTY, C., BEORLEGUI, N., BECONI, M. Reactive oxygen species requirements in bovine sperm capacitation and acrosome reaction, **Theriogenology**, v.52, p.289-301, 1999.

PADRON, O.F., BRACKETT, N.L., SHARMA, R.K., KOHN, S., LYNNE, C.M., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. **Fertility and Sterility**, v.67, p.1115-1120, 1997.

PAPA, F.O, GABALDI, S.H., WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, p.39-44, 2000.

PARRISH, J.J.& FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by *swim-up* method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, v.8, p.259-266, 1987.

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, p.859–869, 1995.

PHILLIPS, N.J., MCGOWAN, M.R., JOHNSTON, S.D., MAYER, D.G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.47-61, 2004.

PICKETT, B.W., SULLIVAN, J.J., BYERS M.S., PACE, M.M., REMMENGA, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.2, p.167-73, 1975.

REHMAN, N., COLLINS, A.R., SUH, T.K., WRIGHT Jr., R.W. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1447-52. 1994.

REVELL, S.G., PETTIT, M.T., FORD, T.C. Use of centrifugation over iodixanol to reduce damage when processing stallion sperm for freezing. **Proceedings Joint Meeting Society Study Fertility**, p.38, 1997.

RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., MAES, D., DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on *in vivo* survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**. v.57, p.1669-1681, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

Rodriguez-Martinez H, Barth AD. *In vitro* evaluation of sperm quality related to *in vivo* function and fertility. In: *Reproduction in Domestic Animals* vol. VI Nottingham, UK: Nottingham University Press, p. 39-54, 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. State of art in farm sperm evaluation. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.91-101, 2007.

ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L., MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling test (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1415-1420, 2000.

SALEH, R.A. & AGARWAL, A. Oxidative Stress and Male infertility: Review From Research Bench to Clinical Practice. **Journal of Andrology**, v. 23, p.737-752, 2002.

SAMARDZIJA, M., KARADJOLE, M., GETZ, I., MAKEK, Z., CERGOLJ, M., DOBRANIC, T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p. 1-72, 2006a.

SAMARDZIJA, M., KARADJOLE, M., MATKOVIC, M., CERGOLJ, M., GETZ, I., DOBRANIC, T., TOMASKOVIC, A., PETRIC, J., SURINA, J., GRIZELJ, J., KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p.237-247, 2006b.

SEIDEL, Jr., G.E. Several insights on evaluation of semen. **Animal Reproduction**, v.9, p.329-332, 2012

SHARMA, R.K., VEMULAPALLI, S., KOHN, S., AGARWAL, A. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. **Archives of Andrology**, v.8, p.33-39, 1997.

SHARMA, R.K., AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. (Review). **Urology**. v.48, p. 835-850, 1996.

SHEKARRIZ, M., DEWIRE, D.M., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, v.28, p.31-35, 1995.

SICILIANO, L., MARCIANO, V., CARPINO, A. Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.6, p.5-11, 2008.

SIKKA, S.C., RAJASEKARAN, M., HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v.16, p.464-468, 1995.

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78-86, 1996.

SIKKA, S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.851-862, 2001.

SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M., COLENBRANDER, B., ROELEN, B.A. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v.67, p. 609-619, 2007.

SMITH, R., VANTMAN, D., ESCOBAR, J., LISSI, E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 11, p.1655–1660, 1996.

SOUZA, C.E.A., MOURA, A.A., LIMA-SOUZA, A.C., KILLIAN, G.J. Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.535-543, 2011.

SUMANTRI, C., BOEDIONO, A., OOE, M., SAHA, S., SUZUKI, T. Fertility of sperm from a tetraparental Chimeric bull. **Animal Reproduction Science**, v.46, p.35–45, 1997.

TELFORD, N.A., WATSON, A.J., SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction of Development**, v.26, p. 90-100, 1990.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective Human. **Reproduction Update**. v.14, p. 243–258, 2008.

TVRDÁ, E., KŇAŽICKÁ, Z., PÉTER, L.B. Impact of oxidative stress on male fertility - A review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p.465-484, 2011.

VAN DER VEN H.H., et al. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. **Human Reproduction**, v.3, p.85-88, 1988.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIANA, J.H.M., SIQUEIRA, L.G.B., PALHÃO, M.P., CAMARGO, L.S.A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.661-676, 2010.

WALTERS, A.H., EYESTONE, W.E., SAAKE, R.G., PEARSON., R.F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v.25, p.554-563, 2004.

WARD, F., RIZOS, D., CORRIDAN, D., QUINN, K., BOLAND, M., LONERGAN P. 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. **Molecular Reproduction of Development**, v.60, p.47-55, 2001

WARD, F, RIZOS, M., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. **Theriogenology**, v.59, p.1575–1584. 2003

WHITTINGTON, K., FORD, W.C. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. **International of Journal Andrology**, v.35, p.222-229, 1999.

APÊNDICE A –

Reduction in force of Mini Percoll centrifugation decreases the formation of reactive oxygen species (ROS) in bovine semen

Gonçalves, C.G.M., Guimarães, A.C.G., Giotto, A., Folchini, N.P., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.B., Brum, D.S.

¹ Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), Uruguaiana-RS, danisbrum@unipampa.edu.br

Several methods have been used in the selection of bovine spermatozoa for in vitro fertilization (IVF), and the Percoll gradient technique the most commonly used. In order to improve the recovery of sperm and serve a market in constant expansion like IVF, from sexed semen and, changes in the force of centrifugation have been applied without previous analysis. Our goal in this study was to evaluate the effect of different centrifugation forces in the process of sperm selection by Percoll Mini on the sperm recovery and viability. Five replicates were conducted, using a *pool* containing semen from four bulls *Bos taurus*, distributed in four treatments: T1 (9000G-Force Control), T2 (Power 6700G), T3 (Power 4500G) and T4 (Force 2200G). The straws were thawed at 35° C for 20", homogenized, semen deposited on 1.5 ml tubes each containing 300ul Percoll gradient (90, 60 and 30%) and centrifuged for 5 ', according to the treatment. The *pellet* formed was resuspended in 300ul of FERT-TALP medium and centrifuged for 1' to 9000G, and 100ul of the final pellet for assessment of viability. The criteria used for evaluation of sperm viability were motility, force, concentration, morphology, membrane integrity and reactive oxygen species (ROS) generation. To evaluate motility, concentration, membrane integrity and spermatozoa morphology a phase contrast microscopy was used. ROS levels in semen were determined by spectrofluorimetric method using 2 ', 7'-dichlorofluorescein diacetate (HD-D). Data were analyzed by chi square (X^2) and ANOVA, the means were compared by Tukey and Duncan test at 5% of significance. The values of membrane integrity, concentration, force and sperm pathology did not differ between treatments. The motility of T3 and T4 (87% and 83%) was higher than T1 (67%), but this did not differ from T2 (71%). Increased formation of ROS was observed in T1 (61.03) compared to T2 (44.19), T3 (41,54) and T4 (46.06), which did not differentiate between them and suggest that the reduction of centrifugation force has provided greater preservation of antioxidant mechanisms of semen, showing a smaller formation of ROS. Based on these results, we conclude that centrifugation forces tested did not affect sperm recovery, with greater sperm viability in the T2, T3 and T4, which generated less ROS. Other studies should be conducted in order to evaluate the influence of centrifugal force reduction in fertilizing capacity and embryo formation. Financial support: FAPERGS (1011575) and CNPq (501763/2009-0).

Apresentado no XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões...**Anais...**Animal Reproduction, v.9, p.439, 2012.

APÊNDICE B –**INFLUÊNCIA DO SÊMEN DE DIFERENTES TOUROS SOBRE AS TAXAS DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES.**

Cecilia Isabel Inês Urquiza Falcão Machado, Antônio Carlos Galarça Guimarães, Cibele Garcia Moreira Gonçalves, Angelo Bertani Giotto, Daniela dos Santos Brum, Fabio Gallas Leivas.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia utilizada amplamente na bovinocultura com o propósito de obter um maior número de embriões, gestações e nascimentos de uma única doadora em um curto período de tempo, acelerando deste modo à produção de animais geneticamente superiores. Para o sucesso de um sistema de PIVE, é necessário um processo de fecundação *in vitro* (FIV) eficiente, capaz de proporcionar alta taxa de penetração espermática. O sêmen utilizado apresenta variações no resultado final do processo da FIV e no desenvolvimento embrionário, sendo que existem diferenças na fertilidade dos touros tanto a campo, como na PIVE. Essas variações podem ser causadas por diversos fatores como: raça, linhagem, idade, estado corporal, nutrição, genética e o ambiente. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do sêmen de diferentes touros na capacidade fecundante e posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*. Foram conduzidas cinco repetições, utilizando-se 440 oócitos bovinos obtidos de ovários de abatedouro, através de aspiração de folículos de 2 a 8-mm. Após seleção, os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24 horas em TCM199 acrescido de LH, FSH, EGF e 10% de soro égua em estro (SEE) em estufa a 39°C, umidade saturada e 5% CO₂ em ar. Decorrido o período de MIV, os oócitos foram transferidos para o meio Fert-TALP com heparina e PHE, onde foram co-incubados por 18h com sêmen dos quatro touros, compondo os diferentes tratamentos: T1, T2, T3 e T4. A dose inseminante utilizada foi de 2x10⁶ espermatozoides/ml, sendo o sêmen de quatro touros previamente selecionados pelo método de centrifugação em gradientes de mini-Percoll. Decorrido o período da FIV, vinte dos prováveis zigotos de cada tratamento, por repetição, foram corados com Hoechst 33342, e avaliados em microscópio de epifluorescência quanto à formação de pró-núcleos, sendo considerados fecundados os oócitos com dois ou mais pró-núcleos. Dois prováveis zigotos de cada tratamento, por repetição, foram cultivados em SOFaaci + 10% SEE e BSA em poços individuais, recobertos por óleo mineral, acondicionadas no interior da incubadora sob as mesmas condições, em um sistema de monitoramento embrionário (Primo Vision, Cryo Mangement Ltda, Hungria), onde foi realizada a captura de imagens dos embriões a cada 5 minutos durante 48h. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem (48h após a FIV) e pelo momento da primeira clivagem, sendo considerados clivados aqueles com duas ou mais células. Os dados foram comparados pelo teste de qui-quadrado X² (p < 0,05). A taxa de fecundação foi semelhante entre os tratamentos T1 (29%), T2 (58%), T3 (52%) e T4 (65%). No desenvolvimento embrionário, não houve diferença entre os índices de clivagem que foram de 78, 83, 86 e 82%, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente. O tempo médio da primeira clivagem foi de 31,7, não diferindo entre tratamentos. Estes dados demonstram que não houve influência dos touros testados na taxa de fecundação ou desenvolvimentos embrionário até 48h. Novos estudos devem ser conduzidos, visando avaliar a qualidade da fecundação e formação de blastocistos.

Palavras chaves: Sêmen bovino, FIV, pró-núcleos, clivagem, embriões

Apresentado no IV Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), Bagé-RS, Dezembro de 2012. – Premiação de melhor trabalho na área de Ciências Agrárias (Pesquisa).