

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

**EFEITO DO CUSHION FLUID® NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS DESTINADOS A
FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES

Uruguaiana, RS, Brasil

2014

CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES

**EFEITO DO CUSHION FLUID® NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS DESTINADOS A
FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

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.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Dos Santos Brum

Uruguiana

2014

CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES

**EFEITO DO CUSHION FLUID® NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS DESTINADOS A
FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

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 12 de agosto de 2014.

Banca examinadora:

Profª Drª Francielli Weber Santos Cibirin

Prof. Dr. Mateus José Sudano

Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas
Orientador

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Ricardo,
Por sua existência,
Por estar sempre ao meu lado,
Pelo companheirismo, incentivo e paciência,
Sempre presente em minha vida,
Com amor e carinho,
Dedico-lhe este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador professor Dr.Fábio Gallas Leivas, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

À professora Dr^a Daniela dos Santos Brum pelos seus ensinamentos e pelo seu apoio, o qual foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À minha mãe, pelo carinho, por estar sempre me apoiando e incentivando. Pelo cuidado com meus filhos. Estando sempre ao meu lado foi muito importante para a conclusão desta etapa.

Aos meus filhos, Ignácio e Mariana, pela oportunidade de conhecer a mais pura forma de amor.

À Raquel, pelo carinho e apoio nas minhas ausências, auxiliando a cuidar da minha família. Sem dúvida, muito importante para a conclusão do meu trabalho.

Ao meu amigo e colega, Mestre Antonio, amigo de todas as horas, pela força, conselhos, ajuda e colaborações. Com certeza sem a sua amizade nesse período, teria sido muito difícil.

A todos do laboratório Biotech, Cecilia, Natália, Daniele, Giovane e os quais os nomes não aparecem, mas que sabem que fizeram parte desse processo e que muito me ajudaram nessa caminhada, o meu muito obrigada. Não tenho e nunca terei como agradecê-los como merecem.

Aos colaboradores Progen, Frigorífico Estância Santa Luíza, os quais disponibilizaram materiais para os experimentos. Sem eles não seria possível a realização do mesmo e à FAPERGS pelo suporte financeiro.

Eu jamais chegaria até aqui sozinha. Minha terna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

RESUMO

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

EFEITO DO CUSHION FLUID® NA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS DESTINADOS A FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

AUTORA: CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES
ORIENTADOR: FÁBIO GALLAS LEIVAS
CO-ORIENTADOR: DANIELA DOS SANTOS BRUM

Uruguaiana, 12 de agosto de 2014.

A técnica de seleção espermática para fecundação *in vitro* (FIV) deve proporcionar além, da recuperação eficiente de espermatozoides, a manutenção da integridade celular. Diversos métodos vêm sendo propostos para a seleção de espermatozoides bovinos destinados a FIV, sendo o método de centrifugação em gradientes de densidade descontínuos de Percoll® o mais utilizado. Em bovinos esta técnica de seleção vem sendo amplamente modificada no que se refere ao volume, número de gradientes, tempo e força de centrifugação, visando aumentar a recuperação espermática, proporcionando um melhor rendimento da dose. Contudo, a etapa de centrifugação, presente nestes protocolos, pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides e assim influenciar nas taxas de fecundação. O presente estudo teve como objetivo determinar a influência da força e do tempo de centrifugação, assim como a associação do meio Cushion Fluid® na segunda centrifugação na seleção espermática por gradientes de Mini Percoll® modificado, através da avaliação de características morfofuncionais, formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), defesas antioxidantes, taxa de fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário em três experimentos. No experimento I, um *pool* contendo sêmen de dois touros *Bos taurus taurus* com fertilidade

conhecida foi submetido ao método de separação por Mini Percoll®, sendo as amostras divididas em quatro grupos e submetidos a duas forças (2200 ou 9000 X g) e dois tempos de centrifugação (1 e 3 minutos). No experimento II e III, um *pool* de sêmen de dois touros *Bos taurus taurus* com fertilidade conhecida foram processados pelo método de Mini Percoll® modificado, sendo adicionado uma quantidade de 150µL de Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany) durante a segunda centrifugação. Foram realizadas avaliações morfofuncionais e bioquímicas das amostras do sêmen destinado a FIV, assim como a capacidade fecundante e o desenvolvimento embrionário dos oócitos fecundados com os espermatozoides selecionados. No primeiro experimento foi observada uma melhora no vigor dos espermatozoides após o gradiente de Mini Percoll®, para todos os tratamentos. No segundo experimento, a taxa de recuperação espermática não diferiu entre os tratamentos, sendo 42,0% ± 4,9 para T1 e 38,6% ± 3,6 para T2 (grupo com adição do Cushion Fluid® na segunda centrifugação). Na morfologia espermática o T2 (5,1 ± 1,1) apresentou menor taxa de espermatozoides com defeitos maiores do que os tratamentos T0 (Pré-Percoll) e T1 (8,8 ± 0,8 e 5,8 ± 1,0). Neste mesmo experimento, os níveis de EROs apresentaram-se aumentados (P < 0,05) no meio com Cushion Fluid® (T2), no entanto, a avaliação das defesas antioxidantes não diferiram entre os tratamentos. No experimento III, não foram observadas diferenças na taxa de fecundação. Este trabalho demonstrou que o uso de uma menor força e tempo (2200 X g/1 min.) de centrifugação pode ser utilizado sem interferir nas taxas de recuperação espermática. O uso do meio Cushion Fluid® durante a centrifugação de espermatozoides bovinos não influenciou a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário até 48 horas.

Palavras-chave: Recuperação espermática, centrifugação, Cushion Fluid®, espermatozoides bovinos, fecundação *in vitro*.

ABSTRACT

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

**EFFECT OF CENTRIFUGATION WITH CUSHION FLUID® IN THE
SELECTION OF CATTLE SPERMATOZOA FOR *IN VITRO*
FERTILIZATION**

AUTHOR: CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES
ADVISOR: FÁBIO GALLAS LEIVAS
CO-ADVISOR: DANIELA DOS SANTOS BRUM
Uruguiana, August 12nd, 2014

The technique of sperm selection for *in vitro* fertilization (IVF) should provide addition, the sperm efficient recovery, the maintenance of cellular integrity. Several methods have been proposed for bovine sperm selection for IVF, and the discontinuous density gradients Percoll® (Sigma Aldrich – St. Louis MO, USA) centrifugation method on the most used. In cattle this selection technique has been extensively modified with respect to the volume, number of gradients, time, and centrifugal force, to increase the sperm recovery, providing a better yield of the dose. However, the centrifugation step present in these protocols, may cause irreversible damage to sperm and thus influence fertilization rate. The present study aimed to determine the influence of centrifugation force and time, as well as the association of the Cushion Fluid® centrifugation on sperm selection by gradients Mini Percoll® modified by evaluating morphological and functional characteristics, ROS formation, antioxidant defenses, rate of *in vitro* fertilization and embryo development. Three experiments carry out. In experiment I, a *pool* containing two semen *Bos taurus taurus* bulls was subjected Mini Percoll® separation method, samples being divided into four groups, with two centrifugal forces (2200 or 9000 X g) and two times (1 and 3 min). In experiment II and III, the *pool* has been processed by the Mini Percoll® modified method, being added to an amount of 150µL

of Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany) in the second centrifugation in the treated group. Morphofunctional and biochemical evaluation of semen samples for IVF, as well as the fertilizing capacity and embryo development of oocytes fertilized with sperms were selected performed. In the first experiment an improvement was observed in the vigor of sperm after gradient Mini Percoll® for all treatments. In the second experiment, the recovery rate sperm did not differ between treatments (T1: 42.0 ± 4.9 and T2 (with adding Cushion Fluid® the second centrifugation): 38.6 ± 3.6). In sperm morphology T2 (5.1 ± 1.1) showed a lower sperm rate with major defects than T0 (Pre-Percoll) and T1 (8.8 ± 0.8 and 5.8 ± 1.0 treatments). In this same experiment, ROS levels were presented increased ($P < 0.05$) in the medium with Cushion Fluid® (T2), however, the evaluation of antioxidant defenses did not differ between treatments. In experiment III, no differences in fertilization rate were observed. This study demonstrated that the use of a smaller force and time ($2200 \times g / 1 \text{ min.}$) to centrifugation can be used without interfering with the sperm recovery rate. The use of the medium Cushion Fluid® during centrifugation of bovine sperm did not influence the fertilization rate and embryo development to 48 hours.

Key-words: sperm recovery, centrifugation, Cushion Fluid®, bovine sperm, *in vitro* fertilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo

Figura 1 – Delineamento Experimental.....	44
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Características espermáticas (média \pm SD) de sêmen bovino avaliadas após a segunda centrifugação com diferentes forças e tempos, após o tratamento com o gradiente de Mini Percoll.....	45
Tabela 2 – Parâmetros espermáticos (média \pm SD) avaliados antes da seleção espermática (T0) e após a segunda centrifugação em meio FIV sem (T1) ou com adição Cushion Fluid® (T2).....	46
Tabela 3 – Índices de fecundação e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> a partir de espermatozoides bovinos obtidos por duas técnicas de seleção espermática.....	47

SUMÁRIO

RESUMO _____	VI
ABSTRACT _____	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES _____	X
LISTA DE TABELAS _____	XI
1 - INTRODUÇÃO _____	14
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	17
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões em bovinos _____	17
2.2 Gradientes descontínuos de Percoll® na seleção de espermatozoides bovinos para FIV _____	19
2.3 Taxa de recuperação de espermatozoides após seleção para FIV _____	24
2.4 Utilização do Cushion Fluid® na seleção espermática _____	27
3 - OBJETIVOS _____	30
3.1 Objetivos Gerais _____	30
3.2 Objetivos Específicos _____	30
4 - ARTIGO CIENTÍFICO _____	31
Resumo _____	32
Abstract _____	33
INTRODUÇÃO _____	34
MATERIAL E MÉTODOS _____	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	38
CONCLUSÃO _____	41
REFERÊNCIAS _____	41
5- CONCLUSÕES _____	48

6 - PERSPECTIVAS _____	49
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	50

1 – INTRODUÇÃO

A reprodução animal constitui-se num dos fatores de maior importância para a eficiência e a rentabilidade dos sistemas produtivos. Com um rebanho bovino estimado em cerca de 212 milhões de animais (IBGE, 2012), o Brasil apresenta avanços em qualidade genética, principalmente devido a utilização das biotecnologias da reprodução. Dentre estas se destaca a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, a qual tem sido incorporada nos programas de melhoramento animal como a técnica de multiplicação e atualmente é responsável por mais de 60% dos embriões produzidos no Brasil (Vianna *et al.*, 2010).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos na PIVE e a sua utilização crescente em programas de melhoramento bovino, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (Neves *et al.*, 2010). Estes resultados se devem, provavelmente, as várias etapas, que se não forem realizadas adequadamente podem comprometer o resultado do processo. Dentre os diversos fatores que afetam o sistema de PIVE de bovinos, encontra-se a seleção espermática para a fecundação *in vitro* (FIV). O espermatozoide é uma célula complexa, que necessita passar por processos fisiológicos para tornar-se apto a fecundação. Para isso os espermatozoides devem passar pelo processo de capacitação espermática, onde adquirem a capacidade de interação com o complexo *cumulus-oócito* e assim realizar a fecundação (Yanagimachi, 1994). Todo esse processo ocorre, naturalmente, no trato reprodutivo da fêmea, onde os espermatozoides atravessam barreiras naturais, que selecionam aqueles aptos à fecundação do oócito. No entanto, nas biotécnicas que utilizam a fecundação *in vitro*, para que este processo ocorra, é essencial a prévia seleção da população espermática a ser utilizada.

O método de seleção espermática deve possibilitar a recuperação de espermatozoides com altas taxas de motilidade, morfológicamente normais, além de eliminar substâncias

indesejáveis (Henkel e Schill, 2003) como agentes descapacitantes e o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, dentre os principais métodos utilizados para a seleção de espermatozoides bovinos destinados a FIV, o método de centrifugação em gradientes descontínuos de Percoll® destaca-se pela sua rápida execução e maior recuperação espermática. Contudo, apesar de sua praticidade, modificações em seu protocolo têm sido realizadas, pois a etapa de centrifugação presente na técnica é prejudicial ao espermatozoide, sendo responsável por danos estruturais, queda da motilidade e na taxa de recuperação espermática, interferindo assim nas taxas de fecundação *in vitro* (Matás, *et al.*, 2007; Sieme *et al.*, 2003). Esses danos são ainda mais importantes no sêmen sexado, pois este apresenta espermatozoides que já sofreram um processo de separação celular (sexagem) que altera a viabilidade das células espermáticas. Considerando esses aspectos, entende-se que o aprimoramento do método de centrifugação em gradiente de Percoll®, principalmente quanto à sua qualidade, poderá tornar viável a aplicabilidade de um método que minimize a perda dos espermatozoides viáveis durante o processo.

A técnica de centrifugação de sêmen é realizada com frequência em programas de reprodução em equinos, com a finalidade de remover o plasma seminal e aumentar a taxa da concentração de espermatozoides no sêmen para inseminação de éguas. No entanto, altas forças de centrifugação causam forte adesão dos espermatozoides no *pellet* (Macpherson *et al.*, 2001), enquanto baixas forças promovem menor recuperação espermática (Waite *et al.*, 2008). Sendo assim, no intuito de reduzir os danos aos espermatozoides de garanhões e aumentar a recuperação foi desenvolvida a técnica de centrifugação com amortecimento. Este método consiste na adição de um colóide, como o Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany), junto ao sêmen durante a etapa de centrifugação. Embora muitos estudos tenham comprovado resultados positivos deste método para o sêmen de garanhão (Bliss *et al.*, 2012) e suínos (Matás *et al.*, 2007), estudos com sêmen bovino destinados a FIV são inexistentes.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes forças, tempo de centrifugação e o meio Cushion Fluid® na segunda centrifugação durante a seleção espermática por gradiente de Mini Percoll®, a fim de maximizar a taxa de recuperação de espermatozoides e minimizar os danos à célula espermática causados pela centrifugação, durante a seleção de espermatozoides bovinos destinados a fecundação *in vitro* (FIV).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção *in vitro* de embriões em bovinos

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma importante biotécnica da reprodução, a qual está associada ao aumento da produtividade, visando maximizar o potencial reprodutivo do rebanho, diminuindo o intervalo entre as gestações e acelerando o melhoramento genético animal.

A PIVE vem apresentando avanços consideráveis e esta sendo lentamente incorporada aos projetos de produção. Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível a recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da TE clássica, no que diz respeito à produção de bezerro por vaca por ano.

Apesar dos avanços obtidos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações tais como os baixos índices de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos ovócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e o custo do embrião que é mais alto do que um embrião de TE. Além disso, bezerras com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumento na incidência de abortos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas tem sido associados a prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (Leibfried-Rutledge, 1999).

Outro fator que tem influenciado, consideravelmente, os resultados em programas de PIVE é a utilização crescente do sêmen sexado, que quando comparado ao sêmen convencional (não sexado), apresenta grande variação na geração de embriões viáveis a

transferência. Zhang e colaboradores (2003), não observaram diferenças significativas entre as taxas de produção de embriões utilizando sêmen sexado, sêmen submetido somente ao corante para sexagem ou sêmen convencional (20,3%, 21,6% e 22,3% respectivamente), concluindo que a separação dos espermatozoides ou o corante utilizado para a separação por citometria de fluxo não interferem no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Contudo, Lu e colaboradores (1999), encontraram diferenças significativas nas taxas de produção de blastocistos utilizando sêmen sexado ou convencional, mas afirmam que a utilização desta biotécnica é viável para programas de PIVE.

O método de PIVE consiste de várias etapas que se não forem realizadas adequadamente podem comprometer o seu sucesso. Dentre os diversos fatores que afetam o sistema encontra-se a qualidade dos ovócitos, os espermatozoides utilizados para a fecundação *in vitro* e as condições de cultivo (Lonergan & Fair, 2008).

Entre as etapas da PIVE, encontra-se a fecundação *in vitro* (FIV). No trato reprodutivo da fêmea, os espermatozoides atravessam barreiras naturais, que selecionam aqueles aptos à fecundação do oócito (Scott, 2000). No entanto, quando são utilizadas técnicas de reprodução *in vitro*, a população espermática a ser utilizada necessita ser potencializada por métodos de seleção (Parrish *et al.*, 1995), principalmente em sêmen que passou por processos de sexagem, congelamento e descongelamento que origina uma série de injúrias aos espermatozoides. Desta forma, para se obter uma maior concentração de espermatozoides viáveis aptos à fecundação *in vitro* e, conseqüentemente, o sucesso da produção *in vitro* de embriões com sêmen descongelado, a seleção espermática possui um papel importante.

Os métodos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfolologicamente normais (Verstegen *et al.*, 2002), o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (Samardzija *et al.*, 2006). Os principais

métodos utilizados para a separação espermática destacam-se *swim-up*, separação por gradiente descontínuo de BSA, filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento (*swim-down*), filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica, separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (Coelho *et al.*, 2000).

2.2 Gradientes descontínuos de Percoll® na seleção de espermatozoides bovinos para FIV

Dentre os métodos, o gradiente de densidade Percoll® é o mais utilizado atualmente para a preparação espermática, devido à alta qualidade na seleção dos espermatozoides (Somfai *et al.*, 2002). Baseia-se no princípio de que sob centrifugação em gradiente de densidade coloidal, as células podem se mover para o local do gradiente correspondente à sua própria densidade, chamado de ponto isopícnico (Mortimer, 1994). Os espermatozoides apresentam densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, portanto podem ser separados de outros componentes do ejaculado, enquanto o plasma seminal permanece na superfície superior. Isso ocorre devido à presença de partículas de sílica coloidais com 15 a 30 nm de diâmetro recobertas por polivinilpirrolidona (PVP) (Samardzija *et al.*, 2006), que se ligam aos espermatozoides de acordo com a sua densidade, estágio de maturação e integridade (Pertoft, 2000).

O Percoll® forma um gradiente descontínuo, onde a densidade aumenta no sentido da camada superior para inferior. Durante a técnica, os espermatozoides mortos, imóveis ou com alterações na membrana plasmática apresentam carga positiva e se ligam facilmente à PVP, que apresenta carga negativa, ficando retidos durante os processos de incubação e centrifugação (Anzar e Graham, 1996). Os espermatozoides móveis podem se orientar na direção da força centrífuga e formar um *pellet* mais rápido do que os imóveis, assim a seleção cuidadosa do tempo de centrifugação e da velocidade permite a separação das duas

subpopulações espermáticas (Morrel, 2006). Espermatozoides com lesão no DNA também são contidos na região superior do gradiente, sendo selecionados somente espermatozoides móveis e potencialmente férteis no *pellet* (Sakkas *et al.*, 2000). Este processo evita a competição dos espermatozoides com DNA danificado com os espermatozoides normais para a fecundação, evitando assim, perdas embrionárias precoces.

Tanghe e colaboradores (2002) mostraram que a centrifugação com gradiente de Percoll® foi fundamental para a separação de espermatozoides, aumentando a percentagem de células vivas e com alta atividade mitocondrial de touros utilizados na FIV. Zúccari e colaboradores (2008) mostraram que a passagem pelo gradiente de Percoll® foi eficaz na seleção de uma maior população de espermatozoides móveis, com membrana plasmática e acrossomal íntegras, sem provocar alterações na condensação da cromatina nuclear.

O método de gradiente de Percoll® seleciona os espermatozoides através da centrifugação (Parrish *et al.*, 1995), com uma taxa de recuperação espermática ao redor de 50%, ou seja, cinco a dez vezes maior que aquela obtida após o *Swim-up* (Avery & Greve, 1995). Brandeis e colaboradores (1993) observaram maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto em sêmen selecionado pelo método de gradiente de Percoll® em comparação ao *swim up*, pois a exposição ao Percoll® protege as células de produções excessivas de radicais livres, os quais causam disfunções de membrana relacionada com peroxidação de seus lipídeos (Oosterhuis *et al.*, 2000). Gonçalves e colaboradores (2012), ao compararem os gradientes de Percoll® (PER; 90 e 45%) e OptiPrep® (OPT; 30 e 26%) usando o método de volume reduzido (600µL) com centrifugação a 5000 X g/5min, observaram maior motilidade e taxa de recuperação usando o gradiente de Percoll® quando comparado ao gradiente OptiPrep® (PER 82,9% e 46,5%, OPT 27,1% e 23,1%, respectivamente). Neste mesmo trabalho, a seleção espermática com gradiente de Percoll® proporcionou maior taxa de produção embrionária do que o gradiente OptiPrep® (PER =

31,5% e OPT = 14,1%). Contrariando estes resultados, Rheingantz e colaboradores (2002), observaram que o método de *Swim-up* apresentou melhores resultados do que o gradiente de Percoll® tanto em relação às taxas de clivagem, como de desenvolvimento até blastocisto.

Na busca de uma máxima recuperação de espermatozoides de boa qualidade, o método de seleção por gradiente de Percoll® sofreu diversas modificações, principalmente pelo aumento da utilização do sêmen sexado (Dell'Aqua *et al.*, 2006), que apresenta algumas desvantagens que estão relacionadas à sua fertilidade, como as baixas taxas de fecundação, clivagem, blastocistos (Lu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2006), gestações e capacitação espermática parcial (Lu e Seidel Jr, 2004), bem como a variação entre touros (Zhang *et al.*, 2003).

As alterações no método de gradiente de Percoll® referem-se basicamente a diminuição do volume, aumento da rotação e redução do tempo de centrifugação (Dell'Aqua *et al.*, 2006). Protocolos tradicionais, os quais preconizam volumes de 2 mL por gradiente de Percoll® utilizado e uma centrifugação a 400 X g, por um tempo de até 30 minutos foram substituídos pelo método denominado "Mini-Percoll®". Estes protocolos consistem em volumes bastante reduzidos, os quais eram inicialmente propostos para a separação de sêmen sexado, atualmente estão sendo empregados com sucesso na FIV com sêmen sexado ou convencional (Machado *et al.*, 2009). Folchini e colaboradores (2012) demonstraram que, na seleção espermática ao utilizarem os gradientes 90, 60 e 30%, a recuperação e a qualidade dos espermatozoides não foram afetadas. No entanto observaram uma menor produção de EROs, quando comparado com os gradientes 90 e 45%. Neste mesmo estudo, observaram uma redução no número de espermatozoides com patologias pós-Percoll®, quando comparado ao sêmen antes do processamento.

Quando o sêmen é manipulado para uso na reprodução *in vitro*, ele é exposto ao oxigênio, e vários passos do seu processamento podem levar à produção de EROs, bem como

à redução das defesas antioxidantes. A lavagem e a diluição, por exemplo, podem retirar ou reduzir a proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal. Todos esses fatores podem contribuir para aumentar os danos oxidativos ao espermatozoide no sêmen manipulado.

As EROs mais comumente geradas pelo espermatozoide são: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Aitken, 1995; De Lamirande e Gagnon, 1999). Já é evidente a participação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, quando em baixas concentrações, nos eventos que culminam com a fertilização em diferentes espécies. Também é conhecida a susceptibilidade do espermatozoide de mamíferos aos efeitos citotóxicos das EROs e ao estresse oxidativo.

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de EROs, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). O sistema enzimático de defesa inclui superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), bem como antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e α -tocoferol (Aitken, 1995). Como a capacidade biosintética do espermatozoide é limitada, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas EROs geradas pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (Aitken, 1995). O balanço entre produção e eliminação de EROs é que determinará os efeitos das espécies reativas do metabolismo do oxigênio no espermatozoide.

A preparação espermática para a FIV de bovinos requer seleção e recuperação de espermatozoides móveis, normais e livres de contaminantes do plasma seminal. Para isso, vários métodos de seleção espermática são utilizados, envolvendo a etapa de centrifugação, a fim de reduzir a concentração do plasma seminal e o aumento da concentração de espermatozoides no sêmen. No entanto, esta etapa é responsável por danos estruturais nos

espermatozoides e queda na motilidade, interferindo nas taxas de fecundação *in vitro* (Matás *et al.*, 2007).

Guimarães e colaboradores (2014) mostraram que altas forças de centrifugação (9000 X g) não influenciaram na 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*. Neste mesmo estudo, observaram que a menor força utilizada (2200 X g) foi eficiente para a seleção de espermatozoides por centrifugação em gradientes descontínuos de Percoll®, pois incrementou as taxas de fecundação *in vitro*, sem reduzir a recuperação espermática.

Nos métodos de *Swim-up* ou gradiente de Percoll® são realizados um ou mais procedimentos de centrifugação, embora o segundo seja mais efetivo do que o primeiro em selecionar espermatozoides viáveis, ambos danificam as membranas celulares e contribuem para a redução na taxa de recuperação espermática. Estas variações estão de acordo com a temperatura, diluidor, volume, tempo e força de centrifugação e volume do sobrenadante deixado no sedimento, deste modo, podendo interferir negativamente na taxa de recuperação espermática (Vidament *et al.*, 2000; Sieme *et al.*, 2003).

A força e o tempo de centrifugação podem interferir na integridade de membrana, pois altas forças de centrifugação causam forte adesão dos espermatozoides no *pellet* (Macpherson *et al.*, 2001), enquanto baixas forças promovem menor recuperação espermática (Waite *et al.*, 2008). Dell'aqua Jr. e colaboradores (2001), quando testaram três forças de centrifugação (600 X g; 800 X g e 1000 X g) e tempos (3 min, 5 min e 10 min) quanto à motilidade e integridade de membrana, os autores encontraram valores significativamente menores ($P < 0,05$) nas forças de 800 X g e 1000 X g por 10 min, e concluíram que, dentre as técnicas avaliadas, a melhor é a de 600 X g/10 min.

Jasko e colaboradores (1991) observaram motilidade espermática maior no sêmen equino submetido à centrifugação (500 X g/18 min) e refrigerado por 24h quando o plasma seminal foi retirado. Porém quando o plasma seminal foi mantido após a centrifugação, houve uma redução imediata da motilidade. Serres e colaboradores (2002) analisando sêmen de jumentos, observaram maior motilidade total e progressiva dos espermatozoides após centrifugação, utilizando uma força de 400 X g/7 min. Raphael (2007) mostrou que a centrifugação causou efeito negativo nas velocidades espermáticas, cujos valores foram superiores no sêmen equino sem centrifugação e que não teve efeito significativo sobre as alterações morfológicas ($P>0,05$). Sieme, Knop e Rath (2006) relataram que a centrifugação causou efeitos deletérios na motilidade e morfologia dos espermatozoides de equinos. Contudo, nestes trabalhos as forças empregadas foram relativamente baixas quando comparadas as aplicadas atualmente.

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.

2.3 Taxa de recuperação de espermatozoides após seleção para FIV

A criopreservação do sêmen causa um decréscimo de aproximadamente 50% da viabilidade espermática, decorrente de efeitos de temperatura e osmolaridade, alterando a organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas (Amann e Pickett, 1987; Thomas *et al.*, 1998). Essas modificações levam os espermatozoides, submetidos à congelamento e descongelamento, a sobreviver menos tempo no trato reprodutivo da fêmea

em comparação com espermatozoides oriundos de sêmen fresco (Watson, 2000) e interferem na PIVE, reduzindo as taxas de recuperação espermática de sêmen destinado à FIV.

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfológicamente normais (Verstegen *et al.*, 2002), o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (Samardzija *et al.*, 2006). Dentre os métodos mais utilizados podemos destacar o método de migração ascendente (*Swim up*), o método de sucessivas lavagens através de centrifugações, os métodos de gradientes de densidade contínuos e descontínuos, como Percoll® e seus substitutivos (Samardzija *et al.*, 2006), o método de filtração em coluna de gel de Sephadex (Lee *et al.*, 2009) e coluna de vidro (Van der Ven *et al.*, 1988). Olivares e colaboradores (2013), ao testarem três diferentes métodos de seleção espermática em sêmen de carneiros, mostraram que o método de Percoll® recuperou mais ($P < 0,05$) espermatozoides ($28,1 \pm 3,3\%$) e com maior motilidade ($55,5 \pm 2,6\%$) que o *Swim-up* ($2,27 \pm 0,3\%$ e $41,1 \pm 5,0\%$, respectivamente), já a taxa de recuperação foi inferior ($P < 0,05$) à obtida na lavagem por centrifugação ($43,3 \pm 3,8\%$). Martí e colaboradores (2006), trabalhando com diferentes métodos para separar espermatozoides de ovinos, observaram a superioridade do método de Percoll® em recuperar uma maior concentração espermática. Somfai e colaboradores (2002) mostraram que, para bovinos a concentração espermática foi maior quando se utilizou o gradiente de Percoll® ($9,3 \times 10^6$ /mL) em relação ao *Swim-up* ($5,8 \times 10^6$ /mL).

O método de gradiente de Percoll®, atualmente é a técnica preferencial para a preparação de espermatozoides bovinos na rotina de FIV, por ser um procedimento rápido, simples e apresentar maior recuperação de espermatozoides, quando comparada com as outras técnicas de seleção espermática e não apresentar variabilidade de resultados quando aplicada por diferentes laboratórios (Parrish *et al.*, 1995). Folchini e colaboradores (2012) observaram

uma recuperação espermática média após o uso do método de Percoll® de $132,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, representando mais de 50% do número de espermatozoide totais antes da centrifugação com Percoll® (239×10^6 espermatozoides/mL). Estes resultados corroboram com diversos estudos que comprovaram a superioridade do método de gradiente de Percoll®, sendo sua capacidade de recuperação um dos seus principais atributos, quando comparado a outras técnicas de seleção espermática (Bollendorf *et al.*, 1994; Cesari *et al.*, 2006). Estudos em ovinos (Valcárcel *et al.*, 1996) mostraram que a técnica de gradiente de densidade de Percoll® recuperou espermatozoides móveis, bem como aqueles com membranas plasmáticas e acrossomal intactas em amostras de sêmen descongelado, não havendo melhora quando se utilizou amostras *in natura* normospérmica.

O sêmen sexado apresenta concentrações espermáticas inferiores (2×10^6 espermatozoides) ao convencional (20×10^6 espermatozoides) por palheta. O padrão alterado de movimentação espermática resulta em dificuldade de sedimentação dos espermatozoides após a seleção de Percoll®, portanto, o número de células recuperadas é menor, resultando em uma concentração inadequada e, conseqüentemente, restringindo a quantidade de oócitos que poderiam ser fecundados. A baixa concentração espermática, obtida após seleção em gradiente de Percoll® está relacionada com taxas mais baixas de clivagem e conseqüentemente, taxas inferiores de produção de blastocistos, comparando a produção com sêmen convencional ou não sexado (Dell'Aqua Jr *et al.*, 2006). Assim, devido ao limitado número de espermatozoides utilizados, pode-se justificar um menor índice de recuperação, uma vez que o processo de congelamento e descongelamento provocam alterações físicas nestes espermatozoides (Watson, 1995). Resende e colaboradores (2009) obtiveram taxa média de recuperação espermática de 6,7% após centrifugação de sêmen descongelado em gradiente de densidade de Percoll®. No entanto, ficou abaixo do alcançado por Hossepian de Lima (2003), que, utilizando espermatozoides recém-colhidos, obtiveram taxa de recuperação

média de 12% após o processo de centrifugação em gradiente de Percoll®. A origem dos espermatozoides utilizados para esse estudo pode justificar esse menor índice de recuperação quando se utiliza sêmen descongelado, uma vez que o processo de congelamento e descongelamento danifica os espermatozoides (Celeghini *et al.*, 2008), levando ao aumento da quantidade de células que ficam retidas nas camadas superiores do gradiente.

Mesmo que os métodos de separação baseados em lavagens e centrifugações possam resultar em danos irreversíveis aos espermatozoides (Centola *et al.*, 1998), estas técnicas são as que apresentam maior recuperação espermática, sendo um dos principais requisitos para o sucesso da PIVE. Sendo assim, ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que comprometa a viabilidade espermática, haverá a possibilidade de melhorar os índices reprodutivos e difundir o uso das biotecnologias, como transferência de embriões (TE), fecundação *in vitro* (FIV) e utilização do sêmen sexado, já que todas utilizam o sêmen criopreservado. Assim, muitos estudos voltados para o aprimoramento de métodos alternativos, que minimizem estes efeitos deletérios nos espermatozoides, estão sendo desenvolvidos. Dentre estes, os métodos de centrifugação com amortecimento, comumente utilizados para a centrifugação de sêmen de equinos e suínos, onde é adicionado um meio junto à centrifugação, a fim de proteger os espermatozoides das altas forças gravitacionais.

2.4 Utilização do Cushion Fluid® na seleção espermática

Visando maximizar a recuperação de espermatozoides de sêmen centrifugado de garanhões e minimizar as lesões à célula espermática causada pela centrifugação, foi desenvolvida a técnica de centrifugação com amortecimento, que utiliza um coloide juntamente ao sêmen (Marcpherson *et al.*, 2001). Revell e colaboradores (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 altas forças de centrifugação, sem perdas na qualidade espermática (Matás *et al.*, 2007).

Matás e colaboradores (2006), quando estudaram dois métodos de centrifugação para sêmen de suíno, observaram um aumento significativo da motilidade no método de centrifugação padrão, sem o meio de amortecimento (Cushion Fluid®), quando comparado ao método de centrifugação com amortecimento. Sieme e colaboradores (2006) observaram aumento na taxa de recuperação de espermatozoides de garanhão após a centrifugação com amortecimento, usando diluidor transparente de sêmen quando comparado ao diluidor opaco a base de leite. Esta diferença pode ser atribuída a uma inadequada aspiração do sêmen, durante a remoção do sobrenadante, pois o *pellet* é melhor visualizado no diluidor transparente do que o diluidor opaco. Contrariando estes resultados, Delhome e colaboradores (2004), em estudo com sêmen de garanhão, observaram uma taxa de recuperação de 83%, usando a técnica de centrifugação com amortecimento em comparação a taxa de recuperação de 75%, usando a técnica de centrifugação padrão. Len e colaboradores (2013), ao comparar duas forças de centrifugação, 900 X g e 1800 X g, não observaram diferenças na taxa de recuperação de espermatozoides (900: 94% e 1800: 97%) para a centrifugação sem amortecimento. No entanto, estes valores foram superiores, quando comparados a centrifugação com amortecimento (900: 68.7% e 1800: 79,6%). Atribuindo assim estes resultados, a aspiração inadequada da solução de amortecimento e a redução do tempo de centrifugação usada neste estudo (10 minutos), quando comparado a outros experimentos com a solução de amortecimento (20 minutos). Bliss e colaboradores (2012) não observaram diferença na motilidade e taxa de recuperação de espermatozoides de garanhão quando estudaram três métodos de centrifugação com o meio de amortecimento (Cushion Fluid®). Porém, este

estudo utilizou sêmen equino logo após a coleta (fresco) e sêmen resfriado. Ao contrário, Sieme e colaboradores (2006), ao estudarem diferentes métodos de centrifugação com amortecimento em sêmen de garanhão, a fim de aumentar as taxas de recuperação de espermatozoides, observaram maior motilidade de espermatozoides, após a centrifugação com o meio de amortecimento, quando comparada a centrifugação sem o meio. No entanto, estudos com esta técnica são inexistentes para a centrifugação durante a seleção espermática de sêmen bovino destinado a FIV. A aplicabilidade destes métodos de centrifugação com amortecimento, principalmente para o sêmen sexado bovino, seria de grande valia, uma vez que este passa por vários processos (sexagem) os quais acarretam danos estruturais e conseqüentemente influenciando na fertilidade.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Avaliar um método de preparação espermática com a utilização de um meio de amortecimento durante a centrifugação, a fim de aprimorar o protocolo de seleção espermática.

3.2 – Objetivos Específicos

- Verificar a influência da força e tempo na segunda centrifugação na seleção espermática por gradientes de Mini Percoll® modificado.
- Avaliar o efeito da associação do meio Cushion Fluid® na segunda centrifugação durante a seleção espermática em gradientes de Mini Percoll® sobre as características morfofuncionais, produção de EROs, defesas antioxidantes, capacidade fecundante de espermatozoides bovinos e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

4 – ARTIGO CIENTÍFICO

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

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito do Cushion Fluid® e redução da força e tempo da segunda centrifugação na seleção de espermatozoides bovinos destinados a fecundação *in vitro*

Effect of Cushion Fluid® and reduced centrifugation force and time of second centrifugation in the selection of cattle spermatozoa for *in vitro* fertilization

Cibele Garcia Moreira Gonçalves^I; Daniela dos Santos Brum^{I,II}; Francieli Weber Santos^I; Daniele Missio^{I,II}; Eduardo Brum Schwengber^I; Natália Picoli Folchini^I; Antonio Carlos Galarça Guimarães^I;
Fábio Gallas Leivas^I

^I Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, RS, Brasil

^{II} Programa de Educação Tutorial – PET Veterinária

Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes forças, tempo de centrifugação e o meio Cushion Fluid® na segunda centrifugação na seleção espermática por gradiente de Percoll® foram realizados três experimentos. No experimento I, um *pool* contendo sêmen de dois touros *Bos taurus taurus* foi submetido ao método de separação por Mini Percoll®, sendo as amostras divididas em quatro grupos, com duas forças de centrifugação (2200 ou 9000 X g) e dois tempos (1 e 3 min). No experimento II e III, o *pool* foi processado pelo método de Mini Percoll® modificado, sendo adicionado uma quantidade de 150µl de Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany) na segunda centrifugação no grupo tratado. O *pellet* resultante do primeiro experimento foi submetido à avaliação morfofuncional e taxa de recuperação. Nos demais experimentos as amostras foram avaliadas quanto ao estresse oxidativo, taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário. O experimento I foi observado uma melhora no vigor dos espermatozoides, após os tratamentos com o gradiente de Percoll®

em relação ao pré-Percoll®. Contudo, não foi observada diferença entre motilidade, vigor e taxa de recuperação de espermatozoides entre os tratamentos. No experimento II, os parâmetros morfofuncionais e produção de EROs do sêmen foram semelhantes entre tratamentos (24,6±8,6), no entanto uma maior produção de EROS foi observada no meio de fecundação realizada com o grupo tratado. No experimento III a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário até 48 horas, não diferiu entre tratamentos. A redução na força e tempo de centrifugação, assim como a utilização do Cushion Fluid® não reduz a recuperação espermática de espermatozoides bovinos durante a seleção por Mini Percoll®.

Palavras-chave: Recuperação espermática, centrifugação, Cushion Fluid®, espermatozoides bovinos, fecundação *in vitro*.

Abstract

In order to evaluate the effect of different forces, time of centrifugation and the medium Cushion Fluid® in the second centrifugation on sperm by gradient of Percoll®. Three experiments were performed. In experiment I, a *pool* containing two semen *Bos taurus taurus* bulls was subjected Mini Percoll® separation method, samples being divided into four groups, with two centrifugal forces (2200 or 9000 X g) and two times (1 and 3 min). In experiment II and III, the *pool* has been processed by the Mini Percoll® modified method, being added to an amount of 150µL of Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany) in the second centrifugation in the treated group. The resulting *pellet* from the first experiment was submitted to morphofunctional assessment and recovery rate. In other experiments samples were evaluated to oxidative stress, fertilization rate and embryo development. The experiment I was observed an improvement in vigor of sperm, after treatments with the gradient of Percoll® compared to pré-Percoll®. However, no difference was observed among motility, vigor and sperm recovery rate between treatments. In experiment II, the morphofunctional parameters and ROS production of semen were similar between treatments

(24.6 ± 8.6), however a greater ROS production was observed in the fertilization medium performed with the treated group. In experiment III the fertilization rate and embryo development up to 48 hours, did not differ between treatments. The reduction in force and time of centrifugation, as well as the use of Cushion Fluid® does not reduce the recovery of bovine sperm during selection of Mini Percoll®.

Keywords: sperm recovery, centrifugation, Cushion Fluid®, bovine sperm, *in vitro* fertilization.

INTRODUÇÃO

O método de seleção espermática deve possibilitar a recuperação de espermatozoides com altas taxas de motilidade, morfologicamente normais, além de eliminar substâncias indesejáveis (HENKEL E SCHILL, 2003), como agentes descapacitantes e ainda evitar o excesso de formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, dentre os principais métodos utilizados para a seleção de espermatozoides bovinos destinados a fecundação *in vitro* (FIV), o método de gradiente descontínuo de Percoll® é o método de eleição na maioria dos laboratórios devido a sua rápida execução e maior recuperação espermática que proporciona, em relação aos demais (AVERY & GREVE, 1995; SOMFAI *et al.*, 2002). Contudo, apesar de sua praticidade, a centrifugação empregada nesta técnica vem sendo apontada como um fator prejudicial à célula espermática, podendo causar danos estruturais aos espermatozoides, queda da motilidade e taxa de recuperação espermática, além de interferir nas taxas de fecundação *in vitro* (MATÁS, *et al.*, 2007; SIEME *et al.*, 2003).

A centrifugação de sêmen é realizada com frequência no processamento de sêmen equino, com a finalidade de remover o plasma seminal e aumentar a concentração de espermatozoides. No entanto, altas forças de centrifugação causam forte adesão dos espermatozoides no *pellet* (MACPHERSON *et al.*, 2001), enquanto baixas forças promovem menor recuperação espermática (WAITE *et al.*, 2008). Sendo assim, no intuito de reduzir os

danos aos espermatozoides de garanhões e aumentar a recuperação foi desenvolvida a técnica de centrifugação com amortecimento. Este método consiste na adição de um colóide, como o Cushion Fluid® (Minitübe, Tiefenbach, Germany), junto ao sêmen durante a etapa de centrifugação. Embora muitos estudos tenham comprovado resultados positivos deste método para o sêmen de garanhão (BLISS *et al.*, 2012) e suínos (MATÁS *et al.*, 2007), estudos com sêmen bovino destinado a FIV são inexistentes.

Considerando esses aspectos, entende-se que o aprimoramento do método de centrifugação em gradiente de Percoll®, poderia reduzir os danos causados pela centrifugação, sem alterar as taxas de recuperação espermática. Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes forças, tempo de centrifugação e o meio Cushion Fluid® na segunda centrifugação na seleção espermática por gradiente de Percoll®, a fim de maximizar a taxa de recuperação de espermatozoides bovinos viáveis destinados a FIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos, com 5 repetições (Figura 1), utilizando-se um *pool* contendo o sêmen congelado de dois touros *Bos taurus taurus* com fertilidade conhecida, sendo as palhetas de 0,25mL descongeladas em banho-maria a 35°C por 20 segundos. No experimento I, após a primeira centrifugação em gradientes descontínuos de Percoll® (30, 60 e 90%) a uma força de 2200 X g, durante 5 minutos, conforme GUIMARÃES e colaboradores (2014) o *pellet* retirado foi homogeneizado e dividido em 4 frações para compor os diferentes tratamentos. Os tratamentos foram distribuídos em duas forças (9000 e 2200 X g) e dois tempos de centrifugação (1 e 3 min.), gerando uma fatorial 2 x 2, compondo os tratamentos: T1 (9000 X g/1'); T2 (9000 X g/3'); T3 (2200 X g/1') e T4 (2200 X g/3'). Neste experimento foram avaliadas as características funcionais (motilidade e vigor) pré e pós-tratamento e taxa de recuperação espermática. No experimento II, após a primeira centrifugação, conforme descrita no experimento I, o *pellet* foi homogeneizado e dividido em duas frações. Para a

segunda centrifugação, cada fração do sêmen foi suspenso em 300µL de meio FERT TALP (PARRISH *et al.*, 1986), sendo uma delas depositada sobre 150µL de Cushion Fluid® e submetidos a centrifugação a 2200 X g por 1 min., compondo os tratamentos: T1 (sêmen + 300µL FERT TALP) e T2 (sêmen + 300µL FERT TALP + 150µL de Cushion Fluid®). Neste experimento, além das variáveis avaliadas no experimento I, foram realizadas avaliações de morfologia espermática, integridade e funcionalidade da membrana espermática e estresse oxidativo. No experimento III, composto pelos mesmos tratamentos do experimento II foram avaliadas a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário até 48 horas após a FIV.

A motilidade e vigor foram avaliadas em microscópio de contraste de fase (100x), sempre pelo mesmo examinador treinado, através de estimativa visual, sendo a motilidade expressa em porcentagem (0 a 100) e do vigor de 0 a 5. As alterações morfológicas dos espermatozoides foram quantificadas a partir de uma preparação úmida, onde 200 células foram contadas, e seus defeitos divididos em maiores e menores (BARTH e OKO, 1989). A taxa de recuperação espermática foi obtida através da fórmula (concentração final x volume final) / (concentração inicial x volume inicial) x 100, conforme MACHADO e colaboradores (2009). A concentração espermática foi calculada pela contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer, sendo o resultado obtido expresso em milhões de espermatozoides/mL. A integridade da membrana plasmática foi avaliada pela técnica descrita por HARRISON e VICKERS (1990), utilizando-se uma mistura de duas sondas Iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC), onde após a incubação, 200 espermatozoides foram contados com auxílio de microscópio de epifluorescência (100 x). Foram considerados íntegros espermatozoides que coraram de verde (acúmulo de DIC) e com lesão os espermatozoides que coraram de vermelho (acúmulo de IP). A funcionalidade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se o teste hiposmótico (Hypoosmotic Swelling Test - HOS), descrito por LOMEIO e GIAMBIERSO, onde após a incubação com auxílio de microscópio

de contraste de fase (400 x) foram contadas 200 células por tratamento, sendo considerados íntegros os espermatozoides que reagiram enrolando a cauda (+HOS).

A avaliação do estresse oxidativo foi baseada na quantificação dos níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs), níveis de Glutathione (GSH) e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os níveis de EROs no sêmen foram determinados por um método espectrofluorimétrico, usando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D). As amostras foram incubadas com 10ul de DCF-D (1mM) no escuro. A oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi medida para a detecção das ROS. A emissão da intensidade fluorescência da DCF foi realizada em 520nm (com excitação de 480nm) 30 minutos após a adição da DCF-D ao meio. Os níveis de GSH foram determinados pelo método de fluorescência de acordo com HISSIN e HILF (1976) usando o-ftalaldeído (OPA) como fluoróforo. As amostras de sêmen (10 µL) foram incubados com 10 µL de OPA (0,1 % em metanol) e 180 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) durante 15 min. à temperatura ambiente no escuro. A fluorescência foi medida com um leitor de microplacas (Chameleon Hidex V Multitechnology Platereader - Modelo 425-156) no comprimento de onda de excitação de 350nm e um comprimento de onda de emissão de 420 nm. Os níveis de GSH foram expressos em nmol de GSH/mL. A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972), na técnica baseada na capacidade de SOD para inibir a auto-oxidação de epinefrina para adrenocromo, onde a cor da reação é monitorada a 480nm e a unidade enzimática (1 UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto-oxidação para 50% a 26°C.

Para a avaliação da fecundação e desenvolvimento embrionário, ovários coletados em abatedouro local tiveram seus folículos entre 2-8 mm de diâmetro aspirados e os complexos *cumulus-oócito* (CCO) classificados conforme DE LOOS (1989). A maturação *in vitro* (MIV) foi conduzida com grupos de 20 CCO, em poços de 400µL de TCM-199 modificado. O

período de maturação foi de 24 horas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Para a fecundação *in vitro* (FIV) o sêmen foi selecionado por gradientes de Percoll®, a dose inseminante foi de 1 x 10⁶ espermatozoides/ml, sendo o dia da FIV considerado dia zero (D0). Após o co-cultivo (oócitos/espermatozoides) por 18h em meio FERT TALP, os prováveis zigotos foram desnudados e destinados a avaliação da fecundação ou desenvolvimento embrionário (experimento III). Para avaliação da fecundação os prováveis zigotos foram incubados por 10min a 39°C em meio TCM 199 modificado acrescido de 15µg/mL de Hoechst e levados ao microscópio de epifluorescência (400 x). Foram considerados fecundados oócitos que apresentavam um ou mais espermatozoides com a cabeça descondensando, presença de dois ou mais pró-núcleos, núcleos fusionados ou embriões clivados. O desenvolvimento embrionário foi avaliado através do cultivo *in vitro* (CIV) em meio Synthetic Oviduct Fluid (SOFaaci; HOLM *et al*, 1999). Os embriões foram transferidos individualmente para micropoços de placas de cultura (Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary) e cultivados em grupos, sob óleo mineral a 39° C, umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar, durante 48 horas após a fecundação. As placas foram acondicionadas no interior da incubadora em um sistema de monitoramento de embrião (Primo Vision time-lapse embryo monitoring system, Cryo-Innovation Technologies, Budapest, Hungary), onde foram realizadas captura de imagens dos embriões a cada 5 minutos. No dia 2, os embriões foram avaliados individualmente quanto à clivagem e o número de células, sendo registrado ainda o tempo decorrido até a primeira clivagem.

As características morfofuncionais foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), a formação dos pró-núcleos pelo teste do qui-quadrado X² (P < 0,05) e a formação de EROs e as avaliações bioquímicas por ANOVA e teste de Duncan (P < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos experimentos vêm sendo conduzidos no intuito de aperfeiçoar o método de seleção por gradientes de Percoll® em bovinos, sendo na maioria dos trabalhos as avaliações realizadas no tempo e na força de centrifugação, ou variando o volume de Percoll® durante a centrifugação nos gradientes (DELL'AQUA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2009). No entanto, a segunda centrifugação realizada durante a técnica, com o intuito de concentrar a amostra e retirar resíduos de Percoll®, normalmente emprega altas forças de centrifugação, o que sem o efeito amortecedor do Percoll®, pode ser extremamente nocivo às células espermáticas, pois resulta em uma grande compactação do sêmen no fundo do tubo. Neste estudo, no experimento I, quando o sêmen após a primeira centrifugação em Percoll® foi distribuído em quatro tratamentos, com duas forças (9000 e 2200 X g) e dois tempos de centrifugação (1 e 3 min.), foi observada uma melhora no vigor dos espermatozoides, após os tratamentos com o gradiente de Percoll® em relação ao pré-Percoll®. Contudo, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre motilidade, vigor e taxa de recuperação de espermatozoides entre os tratamentos (Tabela 1). Estes resultados sugerem que o tempo de um minuto em força de 2200 X g é suficiente para obter uma boa recuperação espermática, reduzindo as chances de danos que possam ser causados às células durante o processo.

Diferentes estudos vêm sendo realizados com sêmen equino e suíno, visando minimizar os danos ocasionados pela centrifugação espermática realizada de forma rotineira nestas espécies com o objetivo de concentrar a amostra antes de sua utilização, principalmente previamente ao congelamento. Dentre as alternativas propostas, a utilização de um colóide para proteger células espermáticas de forças gravitacionais durante o processo de centrifugação tem sido relatada com sucesso por alguns pesquisadores (BLISS *et al.*, 2012; MATÁS *et al.*, 2007). No experimento II, quando o *pellet* resultante da centrifugação em gradientes de Percoll® foi suspenso em dois microtubos contendo 300µL de meio FERT

TALP, com e sem 150 μ L de Cushion Fluid®, visando minimizar o efeito nocivo da centrifugação e conseqüentemente recuperar um maior número de espermatozoides viáveis, não se pode observar incremento ($P>0,05$) nos parâmetros avaliados (Tabela 2). No entanto, ambos os tratamentos conseguiram reduzir ($P<0,05$) o número de defeitos totais em espermatozoides após o processo, o que vem de encontro aos resultados encontrados na literatura. Embora tenha sido observada uma redução ($P<0,05$) na funcionalidade da membrana (+HOS) após os tratamentos, esta não foi comprovada pela integridade de membrana ($P>0,05$), avaliada através de sondas fluorescentes (DIC + IP).

A avaliação do estresse oxidativo tem sido sugerida por diversos autores como um importante marcador para viabilidade espermática, no entanto sua aplicação ainda é limitada, existindo uma grande variedade de testes sendo aplicados, sem um protocolo estabelecido ou valores padrões a serem considerados. Neste trabalho, optou-se por avaliar a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), uma defesa enzimática (SOD), e uma não enzimática (GSH) no sêmen após os diferentes tratamentos e no meio de fecundação após o período de co-cultivo entre oócitos de espermatozoides. Não houve diferença ($P>0,05$) na produção de EROs do sêmen obtido das diferentes amostras ($24,6\pm 8,6$), no entanto uma maior produção de espécies reativas ao oxigênio ($P<0,05$) foi observada no meio onde a fecundação foi realizada com sêmen submetido à centrifugação em meio adicionado de Cushion Fluid® (Tabela 2). Este resultado pode estar associado a um provável resíduo do meio de amortecimento que possa ter sido removido juntamente com o *pellet* e utilizado na FIV, no entanto os demais parâmetros avaliados como SOD ($32,7\pm 6,1$ e $35,3\pm 7,3$ UI) e GSH ($427\pm 135,2$ e $893\pm 505,6$ mM), mantiveram-se semelhantes ($P>0,05$) entre tratamentos, tanto para o sêmen como para o meio de fecundação, respectivamente.

A redução da viabilidade espermática após a o processo de seleção espermática nem sempre pode ser detectada por parâmetros avaliados logo após o processamento do sêmen,

havendo indícios de que algumas alterações podem levar a perdas posteriores na taxa de fecundação ou mesmo desenvolvimento embrionário (SHARMA *et al.*, 1996, KATKOV *et al.*, 1998). Neste trabalho, quando foi avaliada a taxa de fecundação ou desenvolvimento embrionário até 48 horas, não foi possível observar diferença ($P>0,05$) entre o grupo controle e grupo tratado, conforme Tabela 3. Embora a utilização do Cushion Fluid® tenha se mostrado efetiva na proteção de células espermáticas de outras espécies como equino, neste trabalho sua utilização não melhorou os parâmetros avaliados. Diversos fatores podem estar associados a este fato, como o pequeno volume de sêmen utilizado ou mesmo o tempo reduzido de centrifugação empregado. Neste sentido, é necessário que novos estudos sejam conduzidos, utilizando o meio Cushion Fluid® de outras maneiras, visando avaliar seu efeito protetor as células espermáticas.

CONCLUSÃO

A redução na força de centrifugação para 2200 X g, assim como o tempo de centrifugação não reduz a recuperação espermática durante a seleção por Mini Percoll®. A utilização de Cushion Fluid® durante a segunda centrifugação não reduz a recuperação espermática de espermatozoides bovinos, porém não melhora os parâmetros espermáticos pós-seleção ou desenvolvimento embrionário até 48h após a FIV.

REFERÊNCIAS

AVERY, B., GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in insemination *Theriogenology*, v.44, p.871-878, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727782>>. Acesso em: 14 de jun.2013.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*, first ed. Iowa State University Press, Ames, IA.1989.

BLISS, SB; VOGEL, JL; HAYDEN, SS; TEAGUE, SR; BRINSKO, SP; LOVE, CC; BLANCHARD, TL; VARNER; DD. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, v.77, p.1232-1239, 2012. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/221923951>>. Acesso em: 15 nov. 2013. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.10.031.

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., CRESPILO, 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. XX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Araxá, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.205-212, 2006.

GUIMARÃES, A.C.G; LEIVAS, F.G; SANTOS, F.W; E.B. SCHWENGBER, E.B; GIOTTO, A.B; MACHADO, C.I.U; GONÇALVES, C.G.M; FOLCHINI, N.P; BRUM, D.S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*, v.146, p.103-114, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24646635>>. Acesso em: 19 jun. 2014. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.016.

HARRISON, R.A; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690300>>. Acesso em: 20 nov. 2013. doi: 10.1530/jrf.0.0880343.

HENKEL, R.R., SCHILL, W-B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-22, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617368>>. Acesso em: 11 jun. 2013. doi:10.1186/1477-7827-1-108.

HISSIN, P.J., HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v.74, p.214-226, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/962076>>. Acesso em: 15 nov. 2013. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.

HOLM, P; BOOTH, P.J; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reproduction**, v.123, p.553-565, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11914118>>. Acesso em: 25 nov. 2013. doi: 10.1530/reprod/123.4.553.

LOMEO, A.M; GIAMBERO, A.M. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane. **International Journal of Andrology**, v.14, p. 278-282, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1879962>>. Acesso em: 25 nov. 2013. doi: 10.1111/j.1365-2605.1991.tb01093.

KATKOV, I.I., MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, p.232-241, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570748>>. Acesso em: 20 de out. 2013. doi: 10.1002/j.1939-4640.1998.tb01993.

MACHADO, GM; CARVALHO, JO; FILHO, ES; CAIXETA ES, FRANCO, MM; RUMP, F R; DODE, MAN. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation on sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-1297, 2009. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230963>>. Acesso em: 14 nov 2013. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.

MACPHERSON, M.L.; SHORE, M.D.; FERNANDEZ, M.H.; MILLER, C.D.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. **Havemeyer Found, Monograf Series N°6**, New Orleans, USA, p.27-29, 2001.

MATÁS, C., DECUADRO, G., MARTÍNEZ-MIRÓ, S., GADEA, J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar sêmen. **Theriogenology**, v.67, p.1087-1091, 2007. Acesso em: 10 nov. 2013. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178148>>. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.010.

MISRA, H; FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v.247; p. 3170-3175; 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623845>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

PARRISH, J.J; SUSKO-PARRISH, J.L; CRITSER, E.S; EYESTONE, W.H; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726150>>. Acesso em: 18 nov. 2013. doi: 10.1016/0093-691X(86)90143-3.

SHARMA, R.K., AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. (Review). **Urology**, v.48, p.835-850, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973665>>. Acesso em: 15 de out. 2013. doi: 10.1016/S0090-4295(96)00313-5.

SIEME, H., SHAFER, T., STOUT, T.A.E., KLUG, E., WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v.60, p.1153-1164, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935854>>. Acesso em: 10 jun. 2013. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00113-4.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, A.B.; IVÁNCICS, J.; BARANYAI, B.; GÓCZA, E.; KOVÁCS, A. Effect of *Swim-up* and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.285-290, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0531.2002.00350.x>>. Acesso em 03.jun.2013. doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00350.x

WAITE, A., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., TEAGUE, S.R., SALAZAR JR, J.L., MANCILL, S.S., VARNER, D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, v.70, p.704-714, 2008. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573520>>. Acesso em: 14 nov. 2013. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.047.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBILL, E., NEIL, J.D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

FIGURA 1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

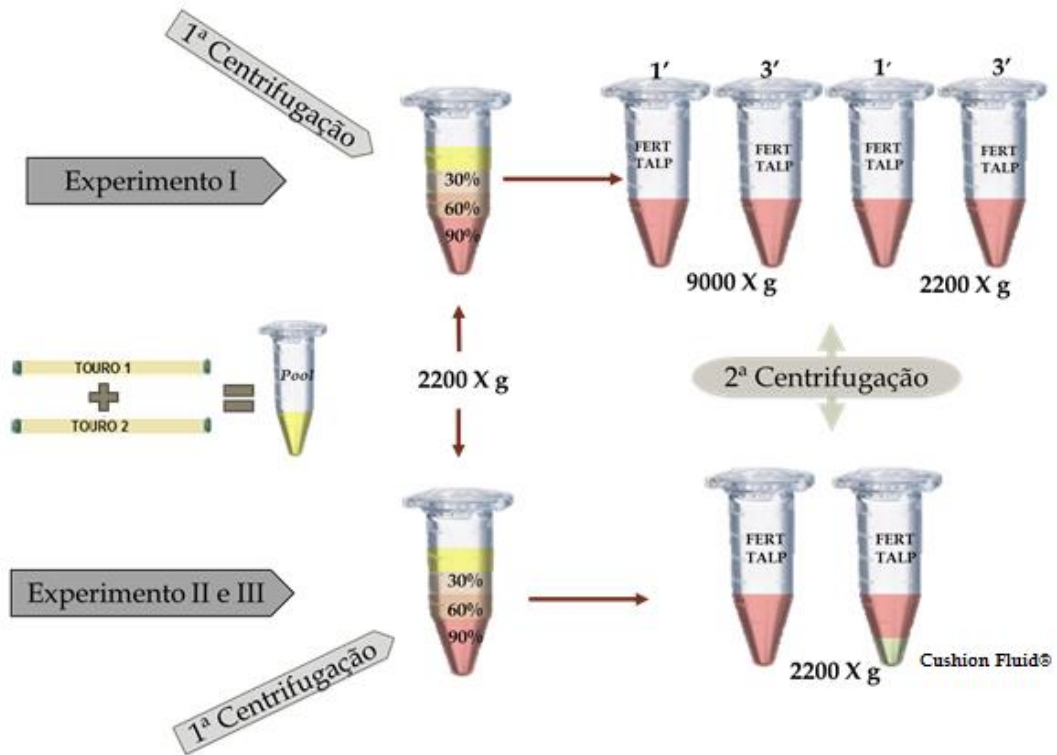


TABELA 1 – Características espermáticas (média \pm DP) de sêmen bovino avaliadas após a segunda centrifugação com diferentes forças e tempos, após o tratamento com o gradiente de Percoll®.

Parâmetros	TRATAMENTOS				
	T0 (Pré Percoll®)	T1 (9000 X g/1')	T2 (9000 X g/3')	T3 (2200 X g/1')	T4 (2200 X g/3')
Motilidade	70,0	76,0 \pm 5,3	76,1 \pm 5,5	74,0 \pm 5,5	70,0 \pm 7,1
Vigor	3,0	4,2 \pm 0,4 ^a	3,6 \pm 0,6 ^{ab}	3,8 \pm 0,4 ^{ab}	3,4 \pm 0,6 ^{ab}
% Recuperação	-	40,6 \pm 8,9	34,4 \pm 7,2	42,4 \pm 11,4	36,0 \pm 5,7

^{a,b} Diferentes sobrescrito na mesma linha indica diferença estatística ($P < 0,05$).

TABELA 2 – Parâmetros espermáticos (média±DP) avaliados antes da seleção espermática (T0) e após a segunda centrifugação em meio FIV sem (T1) ou com adição Cushion Fluid® (T2).

Parâmetros espermáticos	Tratamentos		
	T0 (Pré Percoll®)	T1 s/Cushion Fluid®	T2 c/Cushion Fluid®
Motilidade (%)	80,0 ± 10,0	78,0 ± 4,5	68,0 ± 8,4
Vigor	3,8 ± 0,4	4,2 ± 0,8	4,0 ± 0,7
Recuperação (%)		42,0 ± 4,9	38,6 ± 3,6
+ HOS (%)	51,8 ± 2,2 ^a	38,1 ± 8,7 ^b	35,3 ± 3,2 ^b
DIC + IP (%)	57,0 ± 15,4	40,6 ± 21,1	61,6 ± 14,4
Defeitos Totais (%)	21,8 ± 2,5 ^a	12,6 ± 2,1 ^b	10,4 ± 2,6 ^b
EROS (UF)			
Sêmen	-	21,9 ± 8,5	27,4 ± 8,7
Meio	-	30,9 ± 9,3 ^b	79,9 ± 21,5 ^a

^{a,b} Diferentes sobrescrito na mesma linha indica diferença estatística (P < 0,05).

TABELA 3- Índices de fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* a partir de espermatozoides bovinos obtidos por duas técnicas de seleção espermática.

Tratamento	Fecundação				Clivagem			N células 48 h.
	Total		Normal		1 ^a	Total 48h.		
	N	%	N	%		N	%	
T1 s/Cushion Fluid®	50/101	50	47/50	94	29,1	19/45	42,2	3,4
T2 c/Cushion Fluid®	64/81	79	57/64	89	29,1	32/45	71,1	3,5

(P<0,05)

Fecundação Total (N) = N° de células fecundadas/n° de células avaliadas (Células fecundadas total: uma ou mais cabeças de espermatozoide descondensando no citoplasma do oócito, formação de dois ou mais prónúcleos e células clivadas).

Fecundação Normal (N) = N° de células fecundadas normais/n° de células fecundadas total (Células fecundadas normais: uma cabeça de espermatozoide descondensando no citoplasma do oócito, presença de dois prónúcleos e células clivadas).

Clivagem = Tempo da primeira clivagem (horas e minutos).

Clivagem total 48 h (N) = N° de zigotos 48 horas após a fecundação.

N° Células 48 h. = Média do número de células até 48 horas após a fecundação.

5 – CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou que é possível usar uma menor força e tempo (2200 X g/1') de centrifugação sem interferir na taxa de recuperação espermática.
- A utilização do meio Cushion Fluid® associado a segunda centrifugação durante a seleção espermática em gradientes de Mini Percoll® não influencia a recuperação espermática de espermatozoides bovinos e não melhora os parâmetros espermáticos pós-seleção.
- A associação do meio Cushion Fluid®, durante a segunda centrifugação na seleção de espermatozoides bovinos para a FIV, não influenciou o desenvolvimento embrionário até 48 horas após a fecundação.

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 o efeito da associação do meio Cushion Fluid® com a centrifugação influenciaria a quantidade e qualidade embrionária.
- Determinar os níveis de fragmentação de DNA dos espermatozoides após a centrifugação com o meio Cushion Fluid®;
- Verificar a associação do meio Cushion Fluid® com a primeira ou segunda centrifugação durante a seleção de espermatozoides sexados bovinos destinados a FIV.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANZAR, M., GRAHAM, E.F. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. **Theriogenology**, v.45, p.513-520, 1996.

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

BLISS, SB; VOGEL, JL; HAYDEN, SS; TEAGUE, SR; BRINSKO, SP; LOVE, CC; BLANCHARD, TL; VARNER; DD. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. **Theriogenology**, v.77, p.1232-1239, 2012.

BOLLENDORF, A., CHECK, J.H., KATSOFF, D., FEDELE, A. The use of chymotrypsin/galactose to treat spermatozoa bound with anti-sperm antibodies prior to intra-uterine insemination. **Human Reproduction**, v.9, p.484-488, 1994.

BRANDEIS, V.T., MANUEL, M.T. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v.10, p.409-416, 1993.

CENTOLA, G.M., HERKO, R., ANDOLINA, E. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.70, p.1173-1175, 1998.

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

CESARI, A., KAISER, G.G., 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*. **Theriogenology**, v.66, p.1185–1193, 2006.

COELHO, L.A., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., VANTINI, R., ALMEIDA JUNIOR, I.L. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.397-402, 2000.

DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon C. **The male gamete: from basic science to clinical application**. Vienna, IL: Cache River Press, p.455- 467, 1999.

DELHOMME, G., VIDAMENT, M., ECOT, P., DECUADRO-HANSEN, G. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. Proc. 15th Int. **Congresso de Reprodução Animal**, Porto Seguro, Brasil, v. 2, p.496, 2004.

DELL'AQUA JR, J.A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.458-460, 2001.

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., CRESPILO, 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. XX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Araxá, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.205-212, 2006.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

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.

GONÇALVES, A.O., CARDOSO, T.F., PRADIEÉ, J., MADEIRA, E.M., SANTOS, E.C.S., VIEIRA, A.D., PEGORARO, L.M.C. Percoll® E Optiprep® como mini gradientes para seleção espermática no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos. **In: Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Clima Temperado**, 4, 2012. Ciência e Inovação para 2050: qual o futuro que queremos? Resumos e palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.

GUIMARÃES, A.C.G; LEIVAS, F.G; SANTOS, F.W; E.B. SCHWENGBER, E.B; GIOTTO, A.B; MACHADO, C.I.U; GONÇALVES, C.G.M; FOLCHINI, N.P; BRUM, D.S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, v.146, p.103-114, 2014.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: **Oxford University Press**, p.936, 1999.

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

HOLLINSHEAD, F.K., O'BRIEN, J.K., MAXWELL, W.M., EVANS, G. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.14. p.503-508, 2002.

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

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? XX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Araxá, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 213-224, 2006.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.219-228, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (**IBGE**). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 14 nov. 2013.

JASKO, D.J., LEIN, D.H., FOOTE, R.H. The repeatability and the effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion **Theriogenology**, v.35, p.317-327, 1991.

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., BEEHAN, D.P., LYLE, S.K., ELITS, B.E. Cushioned versus noncushioned centrifugation: Sperm recovery rate and integrity. **Theriogenology**, v.80, p.648-653, 2013.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.

LINDSEY, A.C., MORRIS, L.H., ALLEN, W.R., SCHENK, J.L., SQUIRES, E.L., BRUEMMER, J.E. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.34, p.128-132, 2002.

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

LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL JR. G. E. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393-1405, 1999.

LU, K. H.; SEIDEL JR., G. E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.

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

MACPHERSON, M.L; SHORE, M.D; FERNANDEZ, M.H; MILLER, C.D; THOMPSON, J.A; BLANCHARD, T.L; VARNER, D.D. Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. Havemeyer Found, Monograf Series N°6, New Orleans, USA, p.27–29, 2001.

MARTÍ, E., PÉREZ-PÉ, R., MIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, p.746-753, 2006.

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

MORREL, J.M. Update on Semen Technologies for Animal Breeding. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.63-67, 2006.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals, **Human Reproduction Update**, v.3, p.403-439, 1997.

NEVES, J.P., MIRANDA., K.L., TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.414-421, 2010.

OLIVEIRA, L.Z., LIMA, V.F.M.H., LEVENHAGEN, M.A., SANTOS, R.M, ASSUMPÇÃO, 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.

OLIVARES, C.C.S., BRANDÃO, F.Z., FONSECA, J.F., CAMARGO, L.S.A. Estabelecimento de protocolos para seleção e indução da capacitação espermática em caprinos. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013. (CD-ROM). ISSN: 1984-8471.

PALMA, G.A; OLIVIER, N.S; NEUMULLER, C.H; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.37, p.67-73, 2008.

PARRILLA, I., VÁZQUEZ, J.M., CUELLO, C., GIL, M.A., ROCA, J., DI BERARDINOLAND, D., MARTÍNEZ, E.A. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. **Reproduction**, v.128, p.615-621, 2004.

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.

PERTOF, H. Fractionation of cells and subcellular particles with q Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.44, p.1-30, 2000.

RAPHAEL, C.F. Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária, e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

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

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.

RHEINGANTZ, M.G.T., DESCHAMPS, J.C., PIMENTEL, A.M., PEGORARO, L.M.C. Influência dos métodos do gradiente de Percoll e do *swim-up* sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.312-316, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON, B., ZHANG, B.R., SÖDERQUIST, L. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. **Journal Reproduction e Development**, v.43, p.1-11, 1997.

SAKKAS, D., MANICARDI, G.C., TOMLINSON, M., MANDRIOLI, M., BIZZARO, D., BIANCHI, P.G., BIANCHI, U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v.5, p.1112-1116, 2000.

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, 2006.

SEIDEL JR, G.E., SCHENK, J.L., HERICKHOFF, L.A., DOYLE, S.P., BRINK, Z., GREEN, R.D., GRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1407-1420, 1999.

SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenolog**, v.58, p.329-332, 2002.

SIEME, H., SHAFER, T., STOUT, T.A.E., KLUG, E., WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**. v.60, p.1153-1164, 2003.

SIEME, H., KNOP, K., AND RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 °C for 24 h and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.99–103, 2006.

SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.337-348, 2000.

SHAMSUDDIN, M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic *swim-up* method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 61-75, 1994.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, A.B.; IVÁNCICS, J.; BARANYAI, B.; GÓCZA, E.; KOVÁCS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.285-290, 2002.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYN M & DE KRUIF, A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p. 414–424, 2002.

THOMAS, C.A., GARNER, D.L., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. Effect of Cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

VALCARCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., MOSES, D.F., PEREZ, L.J., BALDASSARRE, H. Comparison between Sephadex G10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 215-224, 1996.

VAN DER VEN, H.H. 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.

VIDAMENT, M., ECOT, P., NOUE, P., BOURGEOIS, C., MAGISTRINI, M., PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improves post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907-919, 2000.

WAITE, A., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., TEAGUE, S.R., SALAZAR JR, J.L., MANCILL, S.S., VARNER, D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, v.70, p.704-714, 2008.

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

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction , Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with Cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481–492, 2000.

WILSON, R.D., FRICKE, P.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., RUTLEDGE, J.J., SYVERSON PENFIELD, C.M., WEIGEL, K.A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.65, p. 1007-1015, 2006.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBILL, E., NEIL, J.D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

ZHANG, M., LU, K. H., SEIDEL, G. E. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, p. 1657-1663, 2003.

ZÚCCARI CESN, CARRIJO PR, LEITE PA, LEITE AP ; SCALDELAI PRR, RODOVALHO NCM , ZANENGA CA, KIEFER C, SILVA, EVCE . Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p. 358-366, abr/jun, 2008.