

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS
ESPERMATOZÓIDES VIÁVEIS (“SWIM-UP”) NA EFICIÊNCIA
DE SELEÇÃO DO SEXO DE BOVINOS POR GRADIENTE
DESCONTÍNUO DE DENSIDADE E O IMPACTO NO
MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL**

Aline Costa de Lucio

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Antonio Techianti Fazano

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Julho – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

L938i Lucio, Aline Costa de
Influência do método de separação dos espermatozoides viáveis
("swim-up") na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente
descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético
animal/ Aline Costa de Lucio. -- Jaboticabal, 2007
xiv, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Banca examinadora: Gisele Zoccal Mingoti, Humberto Tonhati
Bibliografia

1. Gradiente de densidade. 2. Seleção do sexo. 3."Swim-up". I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE COSTA DE LUCIO – nascida na cidade de Campinas, em 4 de agosto de 1981. Em julho de 2004 apresentou trabalho de graduação intitulado “Estabilidade Aeróbia de silagens de capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e milho (*Zea mays* (L.))”. No período de agosto a novembro de 2004 realizou estágio de graduação no Centro de Reprodução Humana de Campinas, totalizando 500 horas de estágio. Formou-se Zootecnista em janeiro de 2005, na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária em Jaboticabal. Iniciou em março de 2005 o curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, ao nível de mestrado na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária em Jaboticabal.

"Deus, dai-me a serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar as coisas que eu possa, e sabedoria para que eu saiba a diferença: vivendo um dia a cada vez, aproveitando um momento de cada vez; aceitando as dificuldades como um caminho para a paz; indagando, como fez Jesus, a este mundo pecador, não como eu teria feito; aceitando que Você tornaria tudo correto se eu me submetesse à sua vontade para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida e extremamente feliz com Você para sempre no futuro."

(Oração da Serenidade escrita por Reinhold Niebuhr)

DEDICO:

*Aos meus pais Lourdes e Felício
e meu irmão Gustavo*

OFEREÇO:

*Aos meus avós Sylvio e Tereza
e ao meu namorado Mateus*

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza e meu refúgio.

Aos meus pais, Lourdes e Felício por me ensinarem tudo que sei em relação aos valores, princípios morais e ética, por me darem conselhos, por me incentivarem e ajudarem a trilhar mais um caminho em minha vida.

Ao meu irmão Gustavo e aos meus avós, Tereza e Sylvio, por estarem sempre presente nas horas mais difíceis, e sempre me trazendo palavras de sabedoria.

Ao Mateus pelo apoio em todos os momentos. Por ter acreditado em mim, sempre me incentivando a nunca desistir, principalmente nos momentos mais difíceis, por ser sempre meu companheiro, amigo e porto seguro.

À Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima que me deu a oportunidade de trabalhar com algo inovador, por ter me acompanhado em cada etapa deste trabalho, ensinando-me não só a pesquisar mas a trabalhar com responsabilidade e princípios em cada dificuldade encontrada na realização desta pesquisa. Agradeço pela confiança em mim depositada e, principalmente pela amizade.

À Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque, ao Dr. Francisco Antonio Techiatti Fazano e a Msc. Mara Ap. de Lúcio por contribuírem diretamente para a realização desta pesquisa, com dicas e conceitos fundamentais para a elaboração deste trabalho.

À minha equipe de trabalho: Ana Paula Perini, Jacqueline Andréa Dernowsek, Max Vitória Resende e Roberta Vantini, por serem colaboradores diretos desta pesquisa, sem eles este trabalho não teria sido concluído. Pela convivência diária, pelas discussões sobre sexagem, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati e a Profa. Dra. Gisele Zocal Mingoti por aceitarem contribuir com seus conhecimentos profissionais para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira, ao Prof. Dr. Danísio Prado Munari e à amiga Daniela Grossi do Amaral, pelo auxílio na análise dos resultados deste experimento.

Às minhas amigas Ana Paula, Eliandra, Jacqueline e Janaina, por estarem sempre ao meu lado durante todos os momentos importantes de minha vida como pós-graduanda, pelo apoio emocional e pelo conforto de palavras amigas durante os momentos de dificuldade.

Às amigas: Ana Paula Coelho, Gerusa, Taissa, pelo companheirismo.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal: Aracelle, Clara, Danilas, Felipe, Juliana, Júnior, Letícia, Lorivaldo, Mabel, Michele, Marcelo, Maria Emília, Maricy, Naiara, Robertinha, Rúbia, Simone, Tatiane, por ajudarem de alguma forma na realização deste trabalho.

Aos funcionários Ivo, Isabel e Paulo, pela amizade e carinho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, em especial à Karina, por ajudarem muito em questões burocráticas, terem paciência e compreensão, principalmente nos momentos de dúvida.

Às pessoas que me incentivaram a trilhar esse caminho com palavras de sabedoria e conforto: todos os meus familiares, (são muitos), João Augusto, Lucia, Drielli, Lílian, Hilário.

À Fapesp pelo auxílio financeiro por tornar possível a realização deste trabalho (Processos: 05/53174-0, 04/06044-0, 05/59357-9).

À Alta Genetics pela contribuição com a doação de doses de sêmen, indispensáveis para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Importância da seleção do sexo no melhoramento genético animal.....	18
2.1.1. A Seleção do Sexo e o Melhoramento Genético de Bovinos Leiteiros.....	21
2.2. Rotas Tecnológicas para a seleção do sexo em animais de interesse zootécnico.....	25
2.2.1. Diferenças no conteúdo de DNA.....	26
2.2.2. Diferenças nas proteínas de membrana.....	29
2.2.3. Diferenças de densidade.....	30
2.2.3.1. Características do Percoll™ como substância formadora de gradiente.....	33
2.2.3.2. Características do OptiPrep™ como substância formadora de gradiente.....	33
2.3. Métodos de validação na seleção do sexo de espermatozóides.....	33
2.3.1. Influência dos procedimentos para produção <i>in vitro</i> de embriões na proporção entre machos e fêmeas.....	33
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Obtenção dos espermatozóides e delineamento experimental.....	36
4.2. Preparação dos gradientes de densidade.....	36
4.2.1. Preparação dos gradientes de descontinuos de densidade.....	36
4.2.2. “Swim-up”.....	38
4.2.3. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides nos gradientes de sexagem.....	39

4.2.4. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides nos gradientes de densidade após “swim-up”.....	40
4.2.5. Controle de Qualidade.....	41
4.2.5.1. Condição Acrossomal.....	41
4.2.5.2. Taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário....	42
4.2.5.3. Obtenção e seleção dos oócitos.....	42
4.2.5.4. Maturação <i>in vitro</i>	43
4.2.5.5. Fecundação <i>in vitro</i>	43
4.2.5.6. Desenvolvimento <i>in vitro</i>	44
4.3. Validação dos resultados.....	44
4.3.1. Verificação do desvio da proporção sexual pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos embriões bovinos.....	44
4.4. Forma de análise dos resultados.....	46
4.4.1. Desvio da proporção sexual dos embriões.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Controle de qualidade dos espermatozóides submetidos ao “swim-up”.....	47
5.2. Controle de qualidade da centrifugação em gradiente descontínuo de densidade	48
5.3. Método “swim-up” associado a centrifugação em gradientes descontínuos de densidade.....	49
5.4. Condição Acrossomal.....	50
5.5. Controle de qualidade considerando como parâmetro a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
6.1. Aspectos técnicos da centrifugação em gradientes descontínuos de densidade associados ou não ao “swim-up”.....	54
6.2. Taxa de recuperação e viabilidade dos espermatozóides após os tratamentos.....	56
6.2.1. “Swim-up”.....	56
6.2.2. Centrifugação em gradiente descontínuo de densidade.....	57
6.2.3. Centrifugação em gradiente descontínuo de densidade associado ao “swim-up”.....	57
6.3. Condição Acrossomal.....	58
6.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões e desvio da proporção sexual.....	62
6.4.1. “Swim-up”.....	62
6.4.2. Gradiente Descontínuo de Densidade.....	64
6.5. Impacto na intensidade de seleção e taxa de reposição.....	65
7. CONCLUSÕES.....	71
8. REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos espermatozóides pós-descongelamento.....	47
Tabela 2. Médias obtidas do controle de qualidade dos espermatozóides processados pelo “swim-up”.....	48
Tabela 3. Médias obtidas do controle de qualidade de espermatozóides centrifugados em Gradiente Descontínuo de Densidade (G14).....	49
Tabela 4. Médias obtidas do controle de qualidade de espermatozóides submetidos ao método “swim-up” associado a centrifugação em Gradiente Descontínuo de Densidade (G14).....	50
Tabela 5. Médias das avaliações da condição acrossomal dos espermatozóides processados pelos seguintes grupos experimentais.....	51
Tabela 6. Controle de qualidade da produção <i>in vitro</i> de embriões considerando como parâmetros as taxas de clivagem e de blastocisto.....	53
Tabela 7. Verificação do desvio proporção sexual pela utilização de espermatozóides sexados na produção de embriões <i>in vitro</i>	53
Tabela 8. Calculo da taxa de reposição e intensidade de seleção, para fêmeas, com base em valores de proporção sexual e taxa de gestação, encontrados no presente experimento e na literatura, assumindo um rebanho com 1000 vacas em reprodução.....	68
Tabela 9. Calculo da acurácia de predição de um touro com base no número de filhas nascidas a partir de inseminação artificial, de acordo com o método de processamento do sêmen, assumindo um rebanho de 110 vacas.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção do gradiente descontínuo de densidade - G14 (B).....	38
Figura 2. Método “swim-up”.....	39
Figura 3. Centrifugação em centrífuga de rotor horizontal refrigerada.....	39
Figura 4. Recuperação dos espermatozóides por um sistema á vácuo.....	40
Figura 5. Sobrenadante do “swim-up” recolhido depositado sobre o gradiente descontínuo de densidade	40
Figura 6. Coloração vital Azul de Tripán/Giemsa. A) espermatozóide morto com acrossoma intacto (MI); B) espermatozóide vivo com acrossoma intacto (VI); C) espermatozóide vivo sem acrossoma (VSA); D) a- espermatozóide morto sem acrossoma (MAS); b-VSA (imagem digitalizada em aumento de 100x).....	42
Figura 7. Avaliação do gel de agarose após PCR por documentação fotográfica STRATAGENE.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- **μL** - microlitro
- **BSA** – Albumina Sérica Bovina
- **COC** – complexo *cumulus* - oócito
- **DMEM** – “Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium”
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- **G14** – Gradiente 14
- **G6PD** – glicose-6-fosfato-desidrogenase
- **GLUT-3** – “Glucose transporter -3”
- **hCG** – Gonadotrofina Coriônica Humana
- **HEPES** – N(2-Hydroxethyl)piperazine –N` (ethanesulfonic acid)
- **HSA** – Albumina Sérica Humana
- **Hsp** – “heat shock protein”
- **IA** – Inseminação Artificial
- **mL** - mililitro
- **MOTE** – múltiplas ovulações e transferência de embriões
- **mRNA** – ácido ribonucléico mensageiro
- **PCR** – reação em cadeia da polimerase
- **PIV** – produção *in vitro*
- **PLP** – “proteolipid protein gene”
- **SFB** – soro fetal bovino
- **SOF** – “synthetic oviduct fluid”
- **TALP** – “Tyrode`s Albumin – Lactate – Pyruvate”

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES VIÁVEIS (SWIM-UP) NA EFICIÊNCIA DE SELEÇÃO DO SEXO DE BOVINOS POR GRADIENTE DESCONTÍNUO DE DENSIDADE E O IMPACTO NO MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL

RESUMO

A produção de doses de sêmen, enriquecidas com espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y, aumentará a contribuição da inseminação artificial para: o incremento do progresso genético, produtividade e retorno econômico nas atividades pecuárias, e para a prevenção de doenças ligadas ao cromossomo X, na espécie humana. Constituiu objetivo do presente trabalho: aplicar o método de “swim-up” associado à centrifugação em gradiente descontínuo de densidade para produzir amostras de sêmen enriquecidas com espermatozóides portadores do cromossomo X, em bovinos. Após os tratamentos, os espermatozóides foram submetidos ao controle de qualidade pela avaliação da integridade acrossomal e taxas de produção de embriões *in vitro*. A validação dos resultados foi feita pela análise da proporção sexual dos embriões produzidos *in vitro* através da amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y presente no genoma bovino. Após a análise dos resultados observou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no desvio da proporção sexual quando comparamos o grupo controle (45,20% de fêmeas) com os procedimentos de separação de espermatozóides (60,65% de fêmeas, em média). Os métodos de separação de espermatozóides, não prejudicaram a fertilidade dos espermatozóides (taxas de clivagem e blastocistos, em média, de 70% e 26% respectivamente). Este pode ser considerado um procedimento a ser utilizado na PIV de embriões bovinos.

Palavras-chaves: bovino, espermatozóides, gradiente de densidade, melhoramento genético, seleção do sexo, “swim-up”.

SWIM-UP INFLUENCE ON BOVINE SEX SELECTION EFFICIENCY BY DESCONTINUOUS DENSITY GRADIENT AND THE ANIMAL BREEDING IMPACT

ABSTRACT

The production of doses of semen enriched with X- and Y- bearing spermatozoa will increase the artificial insemination contribution for genetic progress, productivity and economic return in livestock production and prevention of diseases connected to X chromosome, in humans. The purpose of this work was associated the modified swim-up method with the centrifugation in density gradient for separation of X-bearing spermatozoa. Quality control of centrifuged spermatozoa were evaluated by acrosomal integrity and in vitro embryo production. The results were validated by sex proportion of in vitro produced embryos using PCR by Y- specific sequences present in bovine male genomic DNA. After the determination of genetic sex of in vitro produced embryos, the results showed no statistical difference ($P>0.05$) on deviation of sex ratio when the control group (45.20% female) was compare with the others spermatozoa selection procedures (60.65% female). The spermatozoa selection methods didn't impair fertility of X-bearing spermatozoa (cleavage and blastocyst rates: 70% and 26%, respectively) and would be considered methods of relevance to be introduced on in vitro produced embryos programs.

Key-words: bovine, density gradient, genetic improvement, sex ratio, sperm, swim-up.

1. INTRODUÇÃO

Os registros históricos indicam que as tentativas de seleção do sexo em mamíferos tiveram início com exemplares da espécie humana na Grécia, no período entre 500 a 428 a.C. Esses experimentos tinham como motivação principal a importância cultural e social do sexo masculino entre os povos daquela época (ZARUTSKIE et al., 1989). Documentos pesquisados revelam que havia a crença, naquela civilização, de que a determinação do sexo estava ligada diretamente à posição dos testículos à esquerda ou à direita da bolsa escrotal, o que levava à extirpação de um ou de outro, dependendo do que pretendia o genitor para sua progênie.

Sem essa face cruenta, outros ensaios se repetiram ao longo dos séculos, em outros pontos e datas da história da humanidade. Entretanto, só a partir da década de 70 do século XX é que se ampliaram, de forma mais ordenada, as pesquisas sobre a determinação do sexo dos mamíferos, em função da incorporação de novas técnicas de investigação científica.

JOST, em 1970, relatava que nos mamíferos, a determinação do sexo é definida como uma série de etapas ordenadas que se inicia com o estabelecimento do sexo genético, quando o oócito é fecundado por um espermatozóide portador do cromossomo X ou Y originando, respectivamente, um embrião geneticamente do sexo feminino (XX) ou masculino (XY). O sexo genético é a determinante para que a gônada indiferenciada organize-se como testículo ou ovário (sexo gonadal), estabelecendo-se, a partir da diferenciação gonadal e do seu funcionamento endócrino, o sexo fenotípico.

MILLER & KOOPMAN, em 1990, acrescentaram que o dimorfismo sexual dos mamíferos tem sua base genética na constituição do par de cromossomos sexuais XX ou XY, na qual, a presença ou ausência de seqüências do cromossomo Y induz a determinação primária do sexo (gonadogênese) e que, por sua vez, induz as outras etapas da diferenciação sexual.

Em espécies de interesse zootécnico, os estudos e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo em espermatozóides e em embriões pré-implantados

intensificaram-se a partir da década de 80. Foi esse um processo diretamente ligado ao aprimoramento e à difusão das técnicas de inseminação artificial e de transferência de embriões, recursos utilizados em programas de melhoramento genético animal, que surgiram pela necessidade de modernização dos sistemas de produção animal.

Vários autores registraram, o valor econômico significativo da seleção de sexo na pecuária de leite e de corte, atividades em que, a produtividade é favorecida quando a progênie é constituída, em sua maioria, por um dos sexos (NICHOLAS & SMITH, 1983; TAYLOR et al. 1985; VAN VLECK et al. 1987; RUVUNA et al., 1991).

No século 20, apesar das preferências culturais e sociais ainda favorecerem o sexo masculino, a comunidade médica dedicou-se ao desenvolvimento de técnicas para a seleção do sexo devido à necessidade de prevenção das doenças ligadas ao cromossomo X na espécie humana (ZARUTSKIE et al., 1989).

Nos mamíferos, a seleção do sexo vem sendo conseguida por: separação dos espermatozoides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y, identificação do sexo de embriões pré-implantados e fatores nutricionais e fisiológicos.

Além dos aspectos médico e zootécnico, deve-se considerar a base científica dos métodos de seleção do sexo que evoluem rapidamente, originando conhecimentos que servirão ao desenvolvimento de soluções mais eficientes. O desenvolvimento e o aprimoramento desses métodos, bem como, a sua introdução na tecnologia de sêmen ou de embriões exige uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido é oportuno rever os fatores que desviam a proporção sexual, a importância da seleção do sexo no melhoramento genético e produção animal, bem como as rotas tecnológicas para a seleção do sexo.

Como em várias espécies de mamíferos, existe uma demanda pela seleção do sexo e a quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y é significativamente diferente (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994), consideramos que, nestas espécies, este parâmetro possa permitir separar essas duas populações de espermatozoides por centrifugação em gradiente de densidade.

Em bovinos demonstrou-se que gradientes descontínuos de Percoll e Iodixanol separaram espermatozóides X com acuidade de cerca de 73%. Nestes dois gradientes foi possível recuperar até 25% do total de espermatozóides colocados sobre o gradiente. Até 70% das células recuperadas apresentaram motilidade. Quando esses espermatozóides foram utilizados para a produção de embriões *in vitro* observou-se taxa de clivagem de cerca de 75% e taxa de desenvolvimento embrionário de cerca de 30% (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003).

O desvio da proporção sexual conseguido com as amostras enriquecidas com espermatozóides X poderá ter a acuidade aumentada se forem utilizadas em sistemas de PIV de embriões que favoreçam a produção de mais de 50% de embriões do sexo feminino, e para a inseminação artificial em manejos reprodutivos ou nutricionais que também promovam o desvio da proporção sexual.

Esta técnica de separação de espermatozóides por gradiente descontínuo de densidade é eficiente em separar espermatozóides portadores do cromossomo X, é uma técnica que pode ser considerada de baixo custo. Segundo HOSSEPIAN DE LIMA (2005), este procedimento não altera a eficiência reprodutiva do rebanho, quando o sêmen processado é utilizado em inseminação artificial. Por esse motivo, esta metodologia pode ser aplicada em programas de melhoramento genético animal, por aumentar o número de descendentes a serem selecionados em menor tempo, refletindo no ganho genético anual do rebanho.

A principal desvantagem dessa técnica é a reprodutibilidade e considerando nossa experiência em projetos anteriores, formulamos a hipótese científica: a utilização do método de "swim-up" seguido da centrifugação de espermatozóides viáveis em gradiente descontínuo de densidade aumentará a reprodutibilidade dos resultados de separação de espermatozóides X e Y.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da seleção do sexo no melhoramento genético animal

O principal efeito das tecnologias da reprodução seria o de aumentar a eficiência reprodutiva nos mamíferos. Isto significa que poucos progenitores e progenitoras seriam escolhidos para produzir um dado número de descendentes, quando comparado com os sistemas convencionais de reprodução. Geneticamente, isto resultaria em um aumento da intensidade de seleção e, conseqüentemente, em um aumento do mérito genético médio da progênie. Demonstrou-se por modelos teóricos (simulações) que quando a tecnologia da reprodução era utilizada sobre uma base recorrente em uma população fechada, a taxa de melhoramento genético aumentava entre as gerações. Esta tem sido considerada a principal vantagem genética oferecida pelas tecnologias reprodutivas (NICHOLAS, 1996).

É importante ressaltar que também existem desvantagens no uso destas tecnologias já que elas poderiam aumentar a endogamia e diminuir a variabilidade genética. Neste aspecto, seria importante considerar em que sistema de produção essa tecnologia seria utilizada e a qual sistema de reprodução (inseminação artificial, transferência de embrião) estaria associado.

No caso da seleção do sexo, as rotas tecnológicas disponíveis permitiriam o aumento do número de indivíduos de um dos sexos (masculino ou feminino) na progênie de uma população e incrementariam a intensidade de seleção ou a produção para aquele sexo, em detrimento do outro (BEKMAN et al., 1994). A utilização da seleção do sexo diferiu nas raças com aptidão para a produção de carne e leite, entre os rebanhos comerciais e núcleos de criação.

Estimou-se que a seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite ou carne e em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR et al., 1985; VAN VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992; HOHENBOKEN, 1999; HABERMANN et al., 2005). As raças especializadas para a produção de leite, nas

quais, a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino é um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção. O progresso genético poderá ser maximizado em programas de criação para a produção de leite em que a proporção sexual é controlada por ocasião da inseminação artificial, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (VAN VLECK et al., 1987; HOHENBOKEN, 1999, HABERMANN et al., 2005). Entretanto, esses autores salientam que os benefícios serão observados somente se as técnicas de seleção do sexo não diminuïrem a eficiência reprodutiva (por exemplo, taxas de prenhez inferiores a 60%).

O número de rebanhos submetidos a Programas de Melhoramento Genético e Cruzamento Industrial, que tem tido crescimento expressivo desde 1989, o que permitiu que a utilização da IA apresentasse um aumento de 350% nos últimos 10 anos. Estes mesmos programas permitem que, atualmente, as vendas de sêmen sustentem-se em patamar de 7,0 milhões de doses por ano (Associação Brasileira de Inseminação Artificial, 2005). Além das vantagens zootécnicas, este mercado crescente e potencial para IA é o que justifica o grande interesse na sexagem de espermatozóides por parte das empresas especializadas em congelação de sêmen bovino que operam no Brasil.

O cenário é semelhante na PIV de embriões em que o Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo. São feitas mais de 100 mil transferências de embriões produzidos *in vitro* por ano, que representam 50% do total de 160 mil embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* nos outros países do mundo (Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2004).

O volume de transferências, tanto no Brasil como em outros países, é em média 1-2% do total de vacas registradas, sem perspectivas de um grande aumento (HASLER et al., 2003). Este número é pequeno quando comparado com a porcentagem de fêmeas em idade de reprodução inseminadas no Brasil (5%, Associação Brasileira de Inseminação Artificial, 2004) e no mundo (até 100%, WILMUT et al., 2000).

Apesar das estimavas do aumento do ganho genético, as técnicas de seleção do sexo de embriões não são utilizadas em larga escala nos programas de melhoramento genético animal. Isto se deve ao fato de que as metodologias de sexagem disponíveis para uso comercial: a) comprometem a capacidade fecundante dos espermatozóides;

b) resultam em taxas de prenhez inferiores a 60% e taxas de blastocisto inferiores a 35% (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Nos Estados Unidos, resultados de um teste de campo compararam as taxas de prenhez, conseguidas com espermatozóides sexados por citometria de fluxo, em rebanhos com baixa, média e alta eficiência reprodutiva. A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional foi de 58%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozóides sexados nesses rebanhos as taxas de gestação foram 21, 37, e 35%, respectivamente.

Na Finlândia, outro teste de campo (em uma cooperativa de produção de leite) comparou as taxas de prenhez, conseguidas com espermatozóides sexados por citometria de fluxo (foram utilizadas 157 doses) e com sêmen convencional (foram utilizadas 149 doses). A taxa média de prenhez utilizando doses de sêmen convencional foi de 46%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozóides sexados nesses rebanhos a taxa de gestação foi 21%, respectivamente. Assim nasceram mais bezerras após a IA com sêmen convencional (33 bezerras) do que como sêmen sexado (27 bezerras) (ANDERSSON et al., 2006). Considerando esses resultados, torna-se evidente que os espermatozóides sexados por citometria de fluxo comprometem a taxa de gestação, pelo menos atualmente, e estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen deveriam ter como foco caminhos para se obter um benefício efetivo, incluindo a idade a primeira parição, frente ao custo de utilização (WEIGEL, 2004).

Esse cenário indica a importância de se adotar programas de melhoramento genético capazes de aumentar a produtividade. Entre os parâmetros importantes nesse contexto estão: a) o aumento da eficiência reprodutiva dos machos e fêmeas; b) o aumento do progresso genético por geração. Esses fatores, no seu conjunto, apontam para uma estratégia que alie à tecnologia de sêmen técnicas de seleção do sexo de espermatozóides.

O domínio da seleção do sexo de espermatozóides bovinos poderá beneficiar essa pesquisa na comunidade médica que, no último século, tem se dedicado ao desenvolvimento de técnicas para a seleção do sexo devido à necessidade de prevenção

das doenças ligadas ao cromossomo X na espécie humana (ZARUTSKIE et al., 1989). Existem cerca de 6000 anormalidades genéticas herdáveis sendo que cerca de 500 dessas doenças estão ligadas ao cromossomo X (FUGGER, 1999). Geralmente, as doenças ligadas ao X são expressas por filhos que herdaram da mãe portadora o cromossomo X com genes anômalos. A possibilidade de seleção do sexo para produção de meninas pode reduzir, ou eliminar, a probabilidade de concepção de meninos afetados.

Além dos aspectos médico e zootécnico, deve-se considerar a base científica das técnicas de sexagem que evoluem rapidamente, originando conhecimentos que servirão ao desenvolvimento de métodos mais eficientes. O desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas para seleção do sexo, bem como a sua introdução na tecnologia de sêmen ou de embriões exigem uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido é oportuno rever e justificar as rotas tecnológicas para a seleção do sexo e para a congelação de embriões produzidos *in vitro*.

2.1.1. A Seleção do Sexo e o Melhoramento Genético de Bovinos Leiteiros

Nos programas de melhoramento genético para a produção de leite, o rendimento vem da venda de leite e de material genético. Nesses rebanhos, tem-se como objetivo aumentar o mérito genético para a característica economicamente importante (produção de leite) de uma forma eficiente e com o menor custo possível (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

A seleção do sexo em sistemas de bovinocultura de leite tem como objetivo aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho, aumentar a intensidade de seleção, diminuir o intervalo de gerações e promover um aumento do ganho genético da progênie. Nos rebanhos leiteiros o principal objetivo da seleção do sexo é reduzir ou eliminar o custo de produção de bezerras, produzir bezerras de reposição geneticamente superiores, pela classificação de vacas e touros, de acordo com a estimativa do mérito genético para característica de produção de leite.

Segundo HOHENBOKEN (1999) para realizar a simulação do impacto da seleção do sexo os rebanhos leiteiros eram divididos em comercial e elite (núcleos de criação).

No primeiro, a fonte primária de renda era a produção e venda de leite com uma renda adicional devido à venda de bezerras e descarte de vacas. Geralmente as novilhas de reposição eram selecionadas dentro do próprio rebanho e o aumento do mérito genético era conseguido com a utilização de sêmen de touros provados. Devido à alta taxa de reposição de vacas nos rebanhos comerciais, existiam limitações em conseguir melhoramento genético a partir da reposição de fêmeas adultas por suas filhas, já que as mães eram descartadas antes das filhas terem a primeira cria. No segundo, a fonte primária de rendimento dos núcleos de criação era a produção e venda de animais para a reposição, bem como sêmen e embriões, a venda de leite e o descarte de vacas.

VAN VLECK & EVERETT (1976) desenvolveram um modelo para avaliar o impacto econômico gerado pelo aumento da resposta a seleção de um rebanho comercial para a produção de leite que utilizaria doses de sêmen enriquecidas com espermatozoides X nas vacas mais produtivas e doses de sêmen não enriquecidas nas menos produtivas. No modelo, os custos contabilizavam o número de inseminações necessárias para gerar cada bezerra geneticamente superior e os benefícios incluíam a produção extra de leite e os gastos extras com alimentação necessária para atender as exigências nutricionais das bezerras mais produtivas. Os custos foram projetados para dez anos, resultando no valor da dose enriquecida com 80% de espermatozoides US\$ 9,67 acima daquela enriquecida com 50% de espermatozoides X.

Em estudo posterior, VAN VLECK (1981) simulou o uso de doses de sêmen enriquecidas com espermatozoides X e encontrou um progresso genético anual de 15% na produção de leite, quando utilizadas em rebanhos comerciais para produzir novilhas para a reposição do rebanho. Este aumento do progresso genético foi suficiente para sugerir um custo de US\$ 19.00 por vaca pela utilização de sêmen enriquecido com espermatozoides portadores do cromossomo X. (HOHENBOKEN, 1999).

DEMATAWEWA & BERGER (1998), utilizando um método similar, estimaram que o ganho genético anual aumentaria em 9% e o custo da dose de sêmen, com espermatozoides enriquecidos, seria de US\$ 35.00 por vaca.

VAN VLECK et al. (1987) demonstraram que o ganho genético aditivo anual depende da acuidade de predição do valor genético aditivo, da intensidade de seleção, do desvio padrão dos valores genéticos aditivos e do intervalo de gerações.

Outra forma de se aumentar o progresso genético em rebanhos leiteiros, é a utilização de teste de progênie e a utilização de touros provados como doadores de sêmen o que tem promovido um ganho genético de 2,0 a 2,5% por ano (VAN VLECK, 1981). A grande dificuldade de se utilizar um teste de progênie convencional é não permitir que a eficiência reprodutiva dos melhores touros seja mais explorada quando se utiliza inseminação artificial, o que resulta em um único acasalamento em um período de 365 dias (DEMATAWEWA & BERGER, 1998). A utilização de touros jovens, provenientes dos programas de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE), no teste de progênie aumentou o progresso genético em até 15% ao ano. Quando se utilizou, além de MOTE, doses de sêmen enriquecidas com cromossomo X para a produção de novilhas que seriam selecionadas para serem progenitoras da próxima geração de fêmeas esse ganho atingiu até 30% (DEMATAWEWA & BERGER, 1998).

A seleção do sexo, empregada em teste de progênie que utilizasse a produção *in vitro* de embriões, permitiria o desvio da proporção sexual, em favor do sexo desejado, por ocasião da fecundação ou nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário (NICHOLAS, 1996). Em um teste de progênie convencional que utilizasse doses de sêmen enriquecidas para produzirem acima de 70% de fêmeas, seria possível conseguir um aumento de 25% na taxa de ganho genético entre gerações para a produção de leite (VAN VLECK, 1981).

A intensidade de seleção é função da porcentagem de animais que serão selecionados dentro de uma população. Para cada porcentagem selecionada existe um fator de intensidade de seleção, que é calculado com base em uma população com distribuição normal para determinada característica, e pode ser encontrado em tabelas. Esse fator é uma medida relativa de quanto à média do grupo selecionado excederá a média do grupo de onde os selecionados foram escolhidos (VAN VLECK, 1987).

Quando existe desvio na proporção de sexos, aumenta-se a disponibilidade de animais do determinado sexo para seleção. Se o número de animais que deverão ser selecionados permanece fixo, a porcentagem de animais selecionados diminui, e com isso, aumenta-se o fator de intensidade de seleção, que pode ser considerada um ponto chave, pois pode alterar as taxas de progresso genético.

Como em melhoramento genético de bovinos leiteiros, tanto a seleção de fêmeas, quanto a de machos é importante, deve-se achar uma proporção ideal de nascimentos de ambos os sexos, para que haja um balanço das intensidades de seleção de cada sexo, de modo a gerar o máximo ganho genético para a característica de interesse a ser selecionada (VAN VLECK et al., 1987).

Com base nestas considerações, o presente trabalho se propõe a avaliar o impacto do desvio na proporção de sexos no progresso genético de algumas características de interesse que são selecionadas dentro de programas comerciais de melhoramento genético de bovinos leiteiros, em que o desvio padrão, acuidade de seleção e intervalo de gerações já são conhecidos.

O ganho genético em vacas de leite é determinado pelo mérito genético de touros como pais da próxima geração. O mérito genético desses animais é determinado pela combinação do mérito do “pedigree” de seus pais, do número de touros amostrados, da velocidade e acurácia do teste de progênie, seguido da intensidade de seleção e do máximo uso dos touros selecionados (POWELL et al., 2003). Em sistemas de produção de leite a seleção de touros, para esta característica, é realizada através da performance de suas filhas, de forma que os machos não possuem um fenótipo mensurável para a produção de leite (RENDEL & ROBERTSON, 1950).

O ganho genético para a produção de leite pode ser obtido com a seleção de novilhas e touros jovens (com base no mérito de seus pais) com potencial genético para serem pais da próxima geração. Esses animais passarão seus genes em cruzamentos com mensurações de seus próprios genótipos para a próxima geração, através da performance das vacas e de teste de progênie em touros (RENDEL & ROBERTSON, 1950).

O teste de progênie em touros é conduzido para se obter uma avaliação do mérito genético individual baseado na performance de produção de suas filhas, sendo uma forma de se aumentar o ganho genético anual em sistemas de produção de leite (NORMAN et al., 2003). Alguns autores sugerem associar ao teste de progênie múltiplas ovulações e também a utilização da seleção do sexo de espermatozoides, que aumentaria o diferencial de seleção, a produção de animais para reposição (RENDEL & ROBERTSON, 1950, NICHOLAS & SMITH, 1983), a intensidade de seleção e a acurácia de seleção, e reduziria o intervalo de gerações.

VAN VLECK (1981), avaliando sistemas de produção de leite, relatam que a utilização de teste de progênie e a utilização de touros provados como doadores de sêmen, promovem um ganho genético anual de 2,0 a 2,5%. A utilização de touros jovens provenientes dos programas MOTE, no teste de progênie aumentou o progresso genético para 15% ao ano (Petersen & Hanson, 1997, citados por DEMATAWEWA & BERGER, 1998). Quando se utilizou, além de MOTE, doses de sêmen enriquecidas com cromossomo X para a produção de novilhas que seriam selecionadas para progenitoras da próxima geração de fêmeas, esse ganho atingiu até 30%. Em um teste de progênie convencional, e que utilizasse sêmen enriquecido, para produzir acima de 70% de fêmeas, seria possível conseguir um aumento de 25% no ganho genético anual (VAN VLECK, 1981).

2.2. Rotas Tecnológicas para a seleção do sexo em animais de interesse zootécnico

Duas rotas tecnológicas são percorridas na tentativa de selecionar-se o sexo em mamíferos, principalmente nas espécies de interesse zootécnico: seleção do sexo em espermatozoides (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; SEIDEL, 2003) e identificação do sexo em embriões (MOREIRA-FILHO et al., 2000; RAMALHO et al., 2000).

2.2.1. Diferenças no conteúdo de DNA

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e, até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON e WELCH 1999). Essa diferença é cerca de 4,0 % para os espermatozóides portadores do cromossomo X, e foi constatada em várias espécies de mamíferos (GARNER et al. 1983; JOHNSON 1994). Com base nesta diferença, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozóides: a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade.

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento (U\$ 250,000) e pela baixa produção/equipamento/hora, que não ultrapassa 12×10^6 espermatozóides em alta velocidade de separação (JOHNSON & WELCH, 1999) restringindo bastante sua utilização na indústria da inseminação artificial. Outros fatores limitantes são: a) o baixo número de espermatozóides sexados viáveis; b) a longa exposição ao corante sob alta temperatura (37°C); c) a necessidade de utilizar sêmen *in natura*, já que ocorre a diminuição da eficiência de sexagem de espermatozóides descongelados, devido ao fato da congelação prejudicar a uniformidade da coloração dos núcleos, com o corante Hoechst 33342 (JOHNSON et al., 1994), restringindo assim, a utilização de alguns dos melhores touros (touros provados), dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a produção *in vitro* de embriões; d) diminuições drásticas nos parâmetros de fertilidade avaliados na produção *in vitro* de embriões (BEYHAN et al., 1999).

Em bovinos, a literatura denota que os resultados de fertilidade a campo utilizando os espermatozóides sexados por este método demonstram índices similares comparados à utilização de espermatozóides não sexados, porém em condições experimentais e estritamente controladas, o que inclui a execução e supervisão da inseminação artificial por profissionais (técnicos e médicos veterinários).

A utilização de sêmen sexado em programas de inseminação artificial apresenta uma taxa de gestação de 21% (ANDERSSON et al., 2006). Esses autores obtiveram 46% de gestação após a inseminação artificial com sêmen convencional. Na produção *in vitro* de embriões obtém-se 45% de prenhez utilizando sêmen convencional. Com a utilização de sêmen sexado, sem submetê-los a congelamento, na produção *in vitro* de embriões obtém-se 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento (GUTHRIE et al., 2002).

Um exemplo deste fato foi um estudo recente realizado na Suíça, no qual espermatozoides descongelados e sexados por citometria de fluxo e espermatozoides não sexados (dois milhões/dose) foram depositados no corpo do útero de novilhas e vacas. A taxa média de prenhez conseguida com espermatozoides sexados foi de 29,6% e 23,8%, para novilhas e vacas, respectivamente, enquanto que utilizando espermatozoides não sexados as taxas foram 59,3% para novilhas e 26,6% para vacas, verificados aos 70 a 90 dias após a inseminação artificial (BODMER et al., 2005). Neste mesmo estudo foi constatada uma maior perda embrionária comparada com o controle, quando se utilizaram espermatozoides sexados por citometria, alcançando um índice de 11,1% em novilhas e 15,8% em vacas, e em contraste, utilizando-se espermatozoides não sexados, o índice foi de apenas 2,9% em vacas e de 0% em novilhas.

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos foram utilizados ovários de 104 vacas de alto mérito genético e alta performance fenotípica. Esses ovários foram coletados após a abate, foram aspirados e inseminados com sêmen sexado por citometria de fluxo de três touros da raça Holandesa, que estavam sendo submetidos ao teste de progênie. Após sete dias de cultivo, esses embriões foram transferidos para vacas controle (sem sincronização hormonal) e vacas sincronizadas pelo protocolo Ovsynch. As taxa de prenhez obtida foram de apenas 16,3% para vacas controle e 20% para vacas sincronizadas com o protocolo Ovsynch (WILSON et al., 2005).

Assim, é difícil concluir como seriam os resultados em países como o Brasil, que possuem uma pecuária caracterizada por heterogeneidade de condições de manejo. Neste sentido, considera-se que para a realidade brasileira, é mais interessante optar-se por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem

em torno de 75 %, mas que permita, em condições variadas de manejo, obter-se índices de fertilidade satisfatórios. Além disso, apesar dos tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta) aparentemente não impedirem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, LIBBUS et al. (1987) observaram aberrações cromossômicas em 50% dos espermatozoides de *Microtus oregoni*, após a sexagem por esse método. Ademais, a licença para a utilização da sexagem por citometria de fluxo, é detida por poucas empresas que controlam e restringem a sua utilização comercial ou científica a poucos países e grupos de pesquisadores que visem a sexagem de espermatozoides humanos, bovinos e outras espécies de interesse zootécnico.

MORTON et al. (2007), avaliou os danos causados na expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*, utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão padrão do mRNA em importantes genes indicativos do metabolismo (Glut-3), estresse oxidativo (G6PD), estresse (Hst) e inativação do cromossomo X (Xist). Os oócitos foram coletados de ovários provenientes de abatedouro, maturados e fecundados com sêmen convencional e com sêmen enriquecido com espermatozoides X e espermatozoides Y. O cultivo *in vitro* foi realizado em câmara incubadora modular com atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de Nitrogênio. Após sete e 8 dias os blastocistos foram recolhidos, congelados e armazenados em freezer -80°C. Os blastocistos foram submetidos à extração de RNA e avaliados em PCR - Tempo Real. Os autores concluíram que houve uma redução na fertilidade *in vitro*, ou seja, redução nas taxas de clivagem e blastocistos, causados pela redução da quantidade dos genes transcritos quantificados, quando se utilizou sêmen sexado, comparados com embriões produzidos com sêmen convencional. Podendo concluir, assim, que sêmen sexado por citometria de fluxo retarda o desenvolvimento embrionário, devido a danos no mRNA.

2.2.2. Diferenças nas proteínas de membrana

A despeito de existirem várias publicações e patentes que sugerem a sexagem de espermatozóides por métodos imunológicos, estudos eletroforéticos da membrana dos espermatozóides separados por citometria de fluxo demonstraram que não é possível identificar diferenças entre as proteínas de membrana dos portadores do cromossomo X ou Y, devido à existência de vários mecanismos de prevenção da expressão haplóide e troca de mRNA entre espermátides X e Y através de pontes citoplasmáticas. (HENDRIKSEN et al., 1999).

Os resultados não são conclusivos já que existem cerca de 15 mil transcritos presentes na membrana da população de espermatozóides e o mecanismo de expressão haplóide foi estudado para poucos genes (EDDY, 1998; VENTELÄ et al., 2003). Além disso, existem na literatura exemplos que evidenciam a ocorrência de expressão de genes dos cromossomos X e Y em espermátides (BRADLEY, 1989). Estes trabalhos deixam em aberto a possibilidade de espermatozóides X e Y diferirem quantitativa e qualitativamente em relação a alguns produtos gênicos, (revisado por HENDRIKSEN et al., 1999).

BLECHER registrou em patente (US 5,840,504; 24/11/1998) a identificação das moléculas sexo específicas relatadas no seu trabalho de 1998, descrevendo as possíveis utilizações práticas do seu invento, relatando o desenvolvimento de um método para a sexagem imunológica dos espermatozóides pela identificação de proteínas específicas do sexo (SSP, *Sex Specific Protein*). Esses métodos baseiam-se na identificação e isolamento dessas proteínas, na sua purificação por cromatografia de coluna e na obtenção de anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino e do sexo feminino. Após a incubação com espermatozóides bovinos, os anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino promoveram a aglutinação de 50 % dos espermatozóides. As células que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 92% de embriões do sexo masculino. Não foi relatado se a incubação dos espermatozóides, com anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino desviou a proporção

sexual em favor do sexo feminino. Os autores postularam a presença de diferentes proteínas cromossomais específicas do sexo na superfície dos espermatozoides X e Y, originárias de transcrição e tradução pós-meiótica e que não seriam capazes de atravessar as pontes interespermáticas (BLECHER et al., 1999).

PETER et al. (1993) sugeriram que a separação dos espermatozoides portadores de X daqueles portadores de Y utilizando anticorpos monoclonais associados a contas de polímero magnetizado (separação magnética), pode ter acuidade de cerca de 98 %. Entretanto, há necessidade de repetir a metodologia já que os resultados foram obtidos experimentalmente.

A mais recente patente publicada por BENJAMIN et al. (US 6,153,373, 28/11/2000) descreve o uso de contas magnéticas não porosas ligadas a anticorpos sexo específicos. A separação se dá pela adição ao sêmen de anticorpos específicos para um dos sexos, previamente acoplados às contas. Os espermatozoides tratados são submetidos a um campo magnético e o sobrenadante removido constitui a fração rica em espermatozoides X ou Y. Apesar da técnica descrita nesta patente ser de conhecimento amplo na imunologia e, portanto, consagrada pela eficiência, o autor não relatou o uso dos espermatozoides separados em IA ou qualquer outra técnica que comprovasse a separação dos espermatozoides.

No que se refere à utilização prática da seleção do sexo por métodos imunológicos permanece a limitação da necessidade de mais investigações, utilizando técnicas de identificação de proteínas mais sensíveis, a fim de se produzir de um anticorpo específico do espermatozoide X ou Y.

2.2.3. Diferenças de densidade

Esses métodos envolvem processos de centrifugação e se baseiam na diferença de densidade entre essas duas populações de espermatozoides. A análise da cabeça dos espermatozoides por microinterferometria demonstrou que os espermatozoides X contêm mais DNA e proteína nuclear que os espermatozoides Y e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. Estimou-se que a

diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de pelo menos $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ ou 0,06% da densidade em relação a um espermatozóide X (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999).

Em bovinos, desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll com acuidade de cerca de 73%. Quando utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; 2003; HOSSEPIAN DE LIMA, 2005). O aprimoramento deste método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll e Iodixanol, principalmente, no que se refere à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides. Neste aspecto, torna-se necessário o desenvolvimento de gradientes que possam ser confeccionados com menor grau de dificuldade e em menor tempo como os gradientes contínuos.

Existem dois tipos de gradientes de densidade; a) contínuos: há um aumento gradual da densidade da parte superior do gradiente até a parte inferior, não sendo possível observar as camadas formadas; b) descontínuos: é possível a visualização das camadas dos gradientes, onde, a camada mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo-se nas partes superiores do tubo. Para a formação do gradiente contínuo, há necessidade de se montar um gradiente descontínuo de 3 a 4 camadas, inicialmente, na qual, a transformação ocorre pela difusão destas camadas, colocando-se o tubo na horizontal e reorientado para a posição vertical, novamente. A difusão das camadas pode ocorrer através do resfriamento de um gradiente descontínuo. A vantagem do gradiente contínuo é que ele pode ser feito com densidades maiores (e de maior resolução) e pode ser estocado ou refrigerado, ao contrário do gradiente descontínuo que se for estocado por algum tempo, pode ter as camadas misturadas, necessitando ser preparado no máximo com um dia de antecedência ao procedimento de centrifugação (DENSITY GRADIENT MEDIA, 2003).

Na espécie humana, os métodos de centrifugação em gradiente de densidade com Percoll, tanto para sexagem, como para separação de espermatozóides viáveis para procedimentos como IA e PIV, apesar de satisfatórios, permitindo um alto nível de

resolução, foram abandonados. Isto se deve ao fato de que, na espécie humana, o Percoll teve o seu uso proibido devido ao aparecimento de endometrite nas mulheres inseminadas com sêmen previamente centrifugado em gradiente de densidade composto por meios coloidais cuja composição contém sílica (MAKKAR et al., 1999). No presente estudo os espermatozóides desta espécie foram separados em gradiente de Percoll™. Em projetos anteriores, demonstramos que fêmeas bovinas não tiveram sua fertilidade (taxa de prenhez de 80%) comprometida após inseminação com espermatozóides tratados com Percoll™ (BR PI 0300642, 17 de junho de 2003).

Considerando a importância do controle de qualidade da metodologia de sexagem de espermatozóides proposta no presente projeto, optamos por desenvolver e aplicar algumas técnicas de monitoramento de alguns parâmetros de fertilidade.

Em 1973, ERICSSON et al., utilizando a sedimentação de espermatozóides humanos em gradiente de albumina sérica bovina, conseguiu isolar a uma fração rica em espermatozóides portadores do cromossomo Y (63%). BOTTCHEER-LUIZ (1996), comparou um método de centrifugação em gradiente de densidade de Percoll com a técnica de “swim-up” (migração espermática) associada à sedimentação em gradiente de Albumina Sérica Humana (ASH) para a seleção do sexo de espermatozóides humanos. A visualização do Corpo F, corados com Dicloreto de Quinacrina e observados sob microscopia de fluorescência, demonstrou que o “swim-up” associado à sedimentação em gradiente de ASH (“swim-down”) selecionou os espermatozóides Y com uma acuidade de cerca de 74%, na fração superior do gradiente de albumina, fração inferior encontrou 62% de espermatozóides portadores do cromossomo X.

Em estudos realizados por WANG et. al. (1994), com o objetivo de separar espermatozóides X e Y, de sêmen humanos através de gradientes descontínuos de albumina. Foram utilizados dois tipos de gradientes: um com duas camadas de albumina (10% e 20% de HSA) e outro com três camadas (7,5%, 12,5% e 20% HSA). Em ambos os gradientes foram encontrados maiores valores de espermatozóides portadores do cromossomo X. Para o gradiente de duas camadas encontrou-se 52,7% e no de três camadas encontrou-se 52%.

2.2.3.1. Características do Percoll™ como substância formadora de gradiente

O Percoll™ é um meio bem referenciado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares. A solução estéril é composta por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona (PVP). Com o Percoll™ é possível a formação de gradiente com densidade de até 1,130g/mL, com osmolaridade menor que 300 mOsm/Kg H₂O. Para isso, é necessário se preparar uma solução estoque contendo nove partes de Percoll™ e uma parte de solução com 1,5M de NaCl ou 2,5M de sacarose (VICENT & NADEAU, 1984).

2.2.3.2. Características do OptiPrep™ como substância formadora de gradiente

O OptiPrep™ (solução estéril e não-tóxica composta de Iodixanol a 60% peso/volume - diluído em água) é um componente iodinado não iônico desenvolvido para estudos envolvendo raios X (FORD *et al.*, 1994) e sua fórmula química é 5,5 -[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)-bis(acetylmino)] bis- [N,N bis(2,3dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-benzenedicarboxamide], com peso molecular de 1550. Na separação de organelas sub celulares, o iodixanol apresentou vantagens sobre o Percoll, já que é denso o suficiente para produzir gradientes com densidades de até 1,320 g/mL e com osmolaridade inferior a 300 mOsm/Kg H₂O (FORD *et al.*, 1994; GRAHAM *et al.*, 1994).

2.3. Métodos de validação na seleção do sexo de espermatozóides

2.3.1. Influência dos procedimentos para produção *in vitro* de embriões na proporção entre machos e fêmeas

Existem evidências que suportam a habilidade diferencial do oócito ser fecundado por espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y dependendo do seu estágio de maturação. Utilizando fecundação *in vitro* os autores demonstraram que quando a fecundação após 16 horas de maturação *in vitro* (imediatamente após a extrusão do corpúsculo polar), a proporção de machos em relação às fêmeas foi de 0,5

para 1. Por outro lado, quando a fecundação ocorreu 24 horas após a maturação *in vitro* (8 horas após a extrusão do corpúsculo polar), a proporção de machos e fêmeas foi de 2,2:1 (RORIE, 1999; PARK et al. 2005; AGUNG et al., 2006).

No caso dos embriões produzidos *in vitro*, em bovinos, alguns estudos demonstraram uma associação entre substâncias presentes no meio de cultura com a proporção sexual e as taxas de desenvolvimento. Dentre os componentes que poderiam influenciar estas taxas estaria o soro fetal bovino e a glicose. Meios de cultura com esses componentes favoreceriam o desenvolvimento mais rápido dos embriões do sexo masculino que seriam mais estimulados por estes componentes do que os embriões do sexo feminino (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001).

3. OBJETIVOS

Este presente trabalho tem como objetivos:

a) Avaliar a influência do “swim-up” associado à centrifugação em gradiente descontínuo de densidade para aumentar a eficiência na separação de espermatozoides portadores do cromossomo X, em bovinos.

b) Avaliar os parâmetros de viabilidade dos espermatozoides ao “swim-up” e centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (motilidade, vigor, integridade acrossomal e taxa de produção de embriões *in vitro*).

c) Calcular a intensidade de seleção e taxa de reposição em diferentes proporções sexuais de embriões produzidos *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos espermatozoides

Para a realização deste experimento foram utilizadas doses de sêmen congelado, por empresas especializadas, de 4 animais (2 taurinos e 2 zebuínos), que pós-descongelamento foram submetidos a avaliação da concentração, motilidade e vigor. Essas doses foram submetidas aos 4 grupos que constitui essa dissertação. A raça dos animais não é especificada, pois em trabalhos recentemente desenvolvidos com esta mesma metodologia de separação de espermatozoides, mostraram que a raça não influencia na recuperação espermática e também no desvio da proporção sexual (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

- “swim-up” (Grupo I, código: S)
- Centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Grupo II, código: G14)
- “swim-up” associado a uma centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Grupo III; código: SGD-14)
- Controle (avaliação do sêmen pós descongelamento)
- Controle de Qualidade (motilidade, vigor, produção *in vitro* de embriões e condição acrossomal)
- Os touros utilizados no experimento foram numerados de 1 a 4.

4.2. Preparação dos gradientes de densidade

4.2.1. Preparação dos gradientes descontínuos de densidade

Solução de trabalho para gradiente de Percoll™

A solução estoque (SE 90%) foi preparada diluindo-se 9 partes de sílica coloidal modificada (Percoll™ densidade 1,30 g/mL) em uma parte de DMEM (densidade 1,058 g/mL; 1:9, v/v) concentrado 10 vezes (DMEM 10X) complementado com 0,01 g/L de antibiótico, 6mM de HEPES; pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H₂O.

O DMEM 10X concentrado era preparado diluindo-se em 100 mL de água ultrapura bidestilada do Sistema Milli Q, a quantidade de pó necessária para preparar 1 litro. Em seguida, filtrava-se em membrana com poros de 0,22 μ e era estocado em temperatura entre 4 a 6°C, por no máximo 15 dias.

Para obter os gradientes descontínuos de densidade, soluções isotônicas (280-320 mOsm/Kg de H₂O) com densidades diferentes eram preparadas diluindo-se diferentes porções de SE (Percoll™ 90%) em meio DMEM 1X, complementado com antibiótico, 6mM de HEPES e 0,3 a 0,6% de albumina sérica bovina fração V (BSA); pH 7,4. O DMEM 1 X foi preparado segundo instruções do fabricante. Em seguida, era filtrado em membrana com poros de 0,22 μ e era estocado em temperatura entre 4 a 6°C, por no máximo 15 dias.

O gradiente descontínuo de densidade foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, as camadas de densidades diferentes, em tubos cônicos¹ de poliestireno com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável² (Figura 1). Após a confecção dos gradientes, as amostras de sêmen foram depositadas sobre o gradiente.

O gradiente 14 (G14), foi utilizado neste estudo, era composto por camadas de de soluções de Percoll™ com densidades variando entre 1,110 g/mL a 1,123 g/mL (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Solução de trabalho para gradiente de OptiPrep

A solução foi preparada diluindo, em diferentes proporções o Optiprep em meio DMEM (0,3% de BSA; pH 6,8 a 7,4) para obtenção de densidades acima de 1,123g/mL. A solução de OptiPrep é comercializada pronta para uso, não havendo a necessidade de se fazer estoque.

O gradiente descontínuo de OptiPrep foi preparado depositando-se cada uma das soluções de trabalho, as camadas de densidades diferentes, em tubos cônicos de poliestireno com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável. Após a confecção dos gradientes, as amostras de sêmen foram depositadas sobre o gradiente.

¹ Corning, 430053, New York, USA

² Labsystems, 4540, Helsinki, Finland

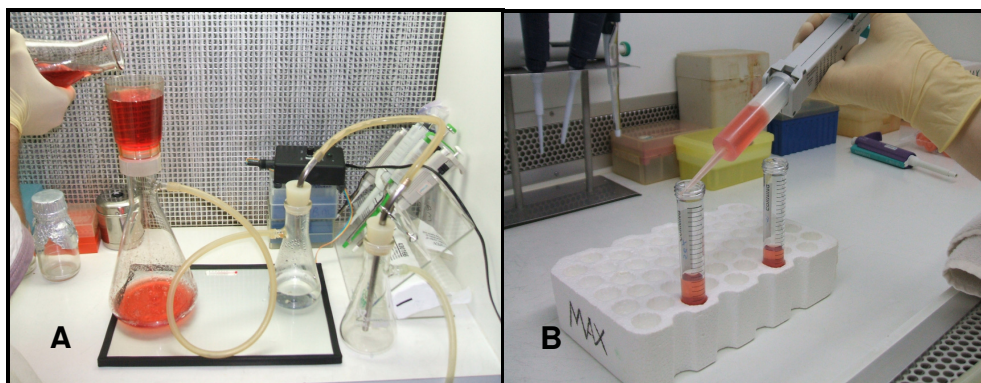


Figura 1: Preparo do meio de cultura utilizado para a confecção dos gradientes (A); confecção do gradiente descontínuo de densidade - G14 (B)

4.2.2. “Swim-up”

O “swim-up” ou Migração espermática é um método baseado na capacidade dos espermatozoides móveis migrarem do sedimento formado após centrifugação, para um meio de cultura enriquecido sobreposto a ele.

O sêmen foi colocado em tubos cônicos de 15 mL e submetido a uma primeira lavagem, para a retirada do diluidor. Foi acrescentado ao sêmen descongelado 5 mL de DMEM 1X, o qual, foi homogeneizado e colocado para centrifugar por 5 minutos a 1300xrpm ou 300xg. Após essa centrifugação o sobrenadante foi retirado, deixando apenas 1ml. A este volume foi acrescentado 5 mL de DMEM, homogeneizado e levado novamente para centrifugar por mais 5 minutos a 300xg (IRIANNI et al., 1990).

Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi totalmente retirado, sem desmanchar o sedimento formado, e foi acrescentado cuidadosamente, 1ml de meio de cultura TALP enriquecido com 0,3% de BSA. O tubo foi incubado em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (Figura 2), onde permaneceu por uma hora. Os espermatozoides móveis migraram para a porção superior, e os espermatozoides mortos e pouco móveis permaneceram no sedimento.



Figura 2: Método “swim-up”

4.2.3. Centrifugação e recuperação dos espermatozoides nos gradientes de sexagem

Oitenta a duzentos milhões de espermatozoides por mililitro foram depositados sobre cada gradiente descontínuo de Percoll™. Os gradientes eram centrifugados de 500 a 1500 x *g* em rotor horizontal, por 15 minutos, a 22°C (Figura 3). Os sobrenadantes de todos os tubos foram retirados concomitantemente com a adaptação de um sistema de um sistema de vácuo (Vacusafe – Figura 4). Os sedimentos de espermatozoides também eram recuperados com mesmo sistema de vácuo e utilizados nos procedimentos de controle de qualidade e validação dos resultados.



Figura 3: Centrifugação em centrífuga refrigerada de rotor horizontal

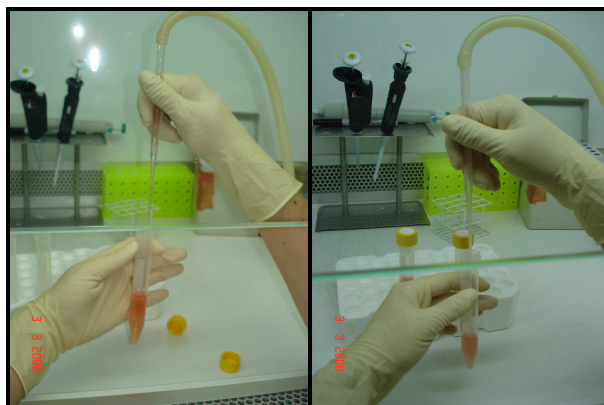
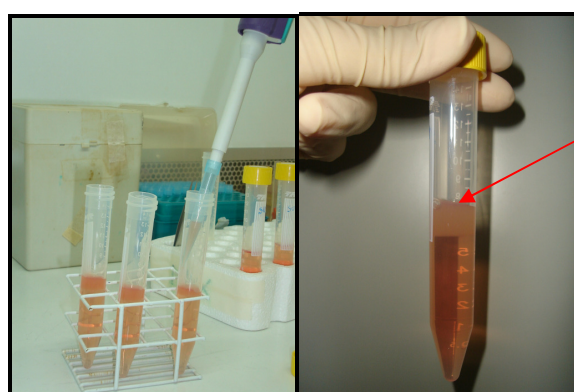


Figura 4: Recuperação dos espermatozóides por um sistema á vácuo.

4.2.4. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides submetidos ao gradiente de densidade associado ao “swim-up”

Oitenta a duzentos milhões de espermatozóides por mililitro foram submetidos ao método do “swim-up” (como descrito no item 4.2.2). Os espermatozóides recuperados no sobrenadante foram depositados sobre cada gradiente descontínuo de densidade (Figura 5). Os gradientes eram centrifugados e os sedimentos recuperados como descrito no item 4.2.3. Os sedimentos de espermatozóides foram utilizados nos procedimentos de controle de qualidade e validação dos resultados.



Sobrenadante obtido após o “swim-up”.

Figura 5: Sobrenadante do “swim-up” recolhido depositado sobre o gradiente descontínuo de densidade.

4.2.5. Controle de Qualidade

O controle de qualidade foi feito em cada etapa dos procedimentos de sexagem avaliando-se os parâmetros de motilidade e integridade da membrana plasmática.

4.2.5.1. Condição acrossomal

O controle de qualidade foi feito colhendo-se uma alíquota de sêmen imediatamente antes e após a centrifugação em gradiente de densidade, após o “swim-up” e após o método de recentrifugação, para avaliar: a condição acrossomal utilizando-se coloração vital Azul de Tripán/Giemsa conforme a descrição de KOVACS & FOOTE (1992).

Uma alíquota de 20µl foi retirada de cada tubo, ou seja, de cada repetição, foi colocada em um microtubo de 1,5mL, foi adicionado 20µl de Azul de Tripán 0,4%³ e foi incubado em banho seco a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 1mL de água destilada foi adicionado e a suspensão foi centrifugada a 700xg por 5 minutos, para a retirada o excesso de corante. Foram feitas duas lavagens para cada amostra. Depois de retirar o sobrenadante, a amostra foi ressuspendida com 0,5mL de água destilada e foram feitos dois esfregaços, que após secos em fluxo de ar, foram fixados em metanol por 5 minutos. Após a secagem desses esfregaços, os mesmos foram mergulhados na solução de Giemsa 10% onde permaneceram por um período de 18 a 20 horas.

Foram analisados, em microscópio binocular em aumento de 1000X, sem contraste de fase, 100 espermatozóides por lâmina identificando as seguintes classes distintas de espermatozóides: 1) vivo intacto (VI); 2) vivo sem acrossoma (VSA), 3) morto intacto (MI); 6) morto sem acrossoma (MSA), como demonstrado na Figura 6.

Os espermatozóides com coloração rósea foram classificados como vivos, os de coloração azulada foram classificados como mortos, e o acrossoma foi classificado como íntegro quando apresentava uma coloração rósea mais forte (Figura 6).

³ Sigma chemical Co., T 8154, Saint Louis, USA

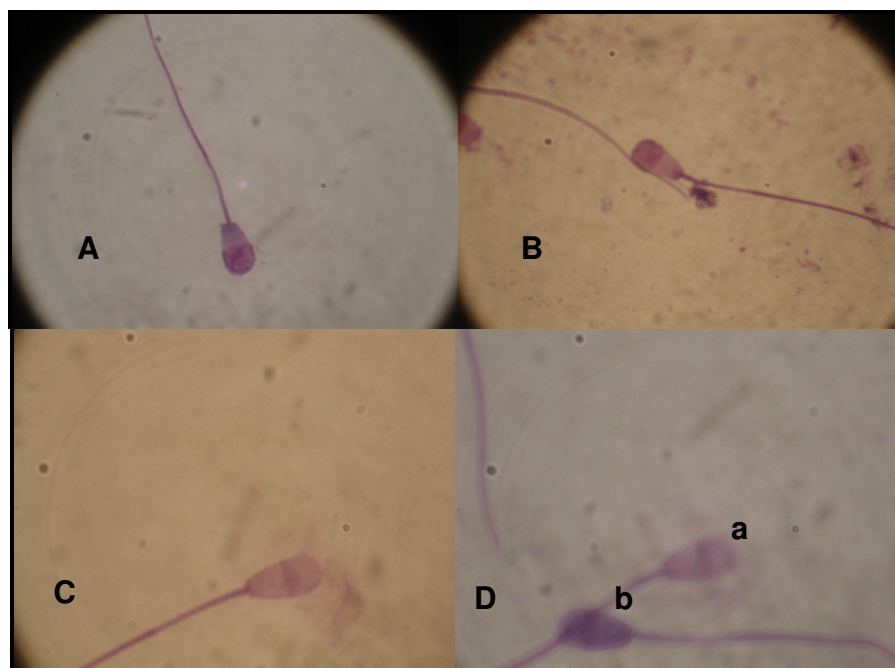


Figura 6: Coloração vital Azul de Tripán/Giemsa. A) espermatozóide morto com acrossoma intacto (MI); B) espermatozóide vivo com acrossoma intacto (VI); C) espermatozóide vivo sem acrossoma (VSA); D) a- espermatozóide morto sem acrossoma (MAS); b-VSA. (imagens digitalizadas em aumento de 1000X).

4.2.5.2. Taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário

O controle de qualidade também foi feito pela avaliação da taxa de clivagem e produção *in vitro* de embriões utilizando os protocolos desenvolvidos no Laboratório de Reprodução Animal, da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal em projetos anteriores (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003) com modificações discutidas nos itens a seguir.

4.2.5.3. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos coletados em abatedouros foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-33°C e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro, foram aspirados por agulha de 19-G acoplada à seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado

foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15 minutos para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Foram selecionados apenas oócitos de *cumulus* (COCS) compacto com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* e ooplasma de coloração uniforme.

4.2.5.4. Maturação *in vitro*

Quanto ao tempo de maturação *in vitro* não pudemos proceder à fecundação até 16 horas após o início da maturação já que seria necessário um maior número de oócitos, pois nessa fase da maturação obtém-se menor taxa de clivagem.

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de Kanamicina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Kanamicina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB. Foram transferidas 20 estruturas/microgota de 100 µl. Os oócitos foram maturados durante 22 a 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.2.5.5. Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 22 a 24 horas após o início do cultivo de maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35°C por 30 segundos. No grupo controle o sêmen era depositado sobre um gradiente de Percoll™ (45% e 90%) à temperatura ambiente e centrifugado a uma força de 900 x g durante 30 minutos, a fim de sedimentar os espermatozóides viáveis. O sedimento espermático resultante desta centrifugação teve o volume medido, foram retiradas duas amostras de 5 µl para determinar a motilidade progressiva e a concentração que era ajustada para 25 mil espermatozóides/µL com motilidade progressiva.

Nos grupos experimentais os espermatozoides foram recuperados como descrito nos itens 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4.

Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 μL de meio TALP-FIV designado a cada grupo experimental. Os oócitos eram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 oócitos por gota de FIV, e eram incubados a $38,5\text{C}^\circ$, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO_2 em ar.

A clivagem foi avaliada 48 horas após a fertilização.

4.2.5.6. Desenvolvimento *in vitro*

Considerando os estudos citados no item 2.3 não utilizamos glicose no meio de desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* baseou-se nos protocolos de VAJTA et al. (1999) e GUTIÉRREZ-ADÁN et al. (2001, 2004). Os prováveis zigotos eram lavados por três vezes em meio SOF (fluido sintético de oviduto) suplementado com 5 mg/mL de BSA, sem SFB e sem glicose e transferidos para placas com quatro poços contendo 500 microlitros do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fecundação. Eram cultivados 60 zigotos por poço, em estufa, com atmosfera de 5% de O_2 , 5% de CO_2 e 90% N_2 , 100% de umidade saturada e temperatura de $38,5\text{C}^\circ$.

Desenvolvimento embrionário foi avaliado 7 dias após a fecundação.

4.3. Validação dos resultados

4.3.1. Verificação do desvio da proporção sexual pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos embriões bovinos

O sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* em bovinos foi identificado por PCR, utilizando-se dois pares de diferentes oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) que amplificam seqüências específicas do cromossomo Y, presente no DNA

genômico de bovinos do sexo masculino (XY) e um par de "primers" com o controle do DNA genômico dos bovinos, conforme descrito por ALVES et al. (2003).

Os dois pares de "primers" escolhidos para a seqüência específica do cromossomo Y foram: "Primer" 1: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3'; "Primer" 2: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'.

O "primer" 1 amplificou uma seqüência de 210 pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI *et al.*, 1989) e o "primer" 2 amplificou uma seqüência de 196 pb em machos (LUZ *et al.*, 2000).

Utilizamos um "primer" específico para o DNA bovino: "Primer" 3 - 5' - AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e 5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'.

Este "primer" amplificou uma seqüência de 280 pb, repetida no genoma bovino (ELLIS & HARPOLD, 1986,1988; ELLIS *et al.*, 1988).

Cada embrião foi colocado em um microtubo de 200µl contendo 10µl de água do Milli-Q autoclavada, e posteriormente foram congelados em nitrogênio líquido por 20-30s, e armazenados em freezer -20°C.

Antes da PCR, foi adicionado 5µg de Proteinase K por embrião, e em seguida os embriões foram submetidos a uma incubação a 37°C por 60 minutos. Logo após tratamento dos embriões com proteinase K para a lise das membranas e exposição do DNA, o DNA exposto era dividido em duas amostras e submetido a duas reações distintas. A primeira contendo a seqüência autossômica (280pb) e a Y-específica (210pb) e a segunda reação composta por outra seqüência Y-específica (196pb), sendo que as ampliações foram realizadas em Termociclador PTC - 100 (M.J. Research, Inc. - Waltham, M.A. - USA). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de 3% de agarose, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Os embriões eram identificados como fêmeas quando somente o produto de 280 pb é visualizado. A presença de duas bandas (280 e 210 pb) na amostra indica que o embrião é do sexo masculino. Este resultado foi confirmado

somente quando uma banda de 196 pb era visualizada. Os géis eram analisados utilizando-se equipamento de documentação fotográfica STRATAGENE (Eagle Eye Software).

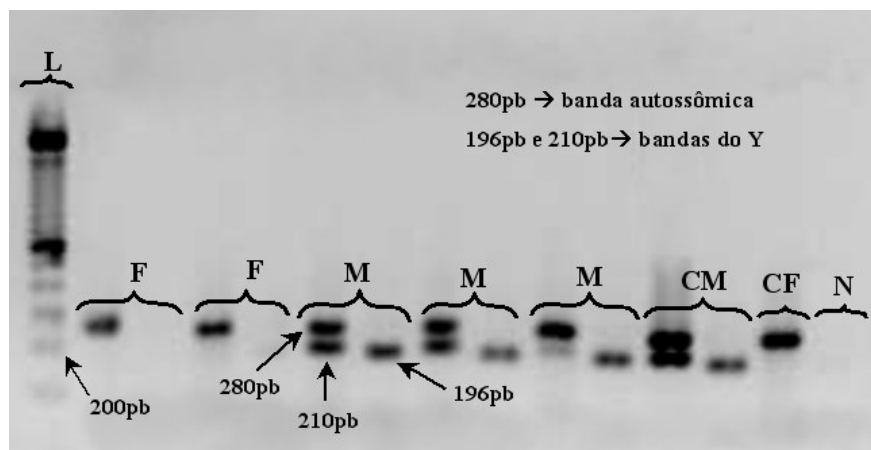


Figura 7. Avaliação do gel de agarose após PCR por documentação fotográfica STRATAGENE (L: leader; F: embrião fêmea; M: embrião macho; CF: DNA puro de fêmea – controle fêmea; CM: DNA puro de macho – controle macho; N: branco).

4.4. Forma de análise dos resultados

4.4.1. Desvio da proporção sexual dos embriões

Para os resultados de taxa de clivagem, taxa de blastocistos e de proporção sexual, obtidos por PCR, foi realizada análise estatística pelo teste do Qui-quadrado (nível de significância de 5%), no qual verificamos a se houve influência no desenvolvimento embrionário e também para verificar a acuidade da sexagem de espermatozoides levando-se em consideração o desvio da proporção sexual do grupo controle. Os resultados de condição acrossomal foram submetidos a uma análise de variância (Teste Tukey), com nível de significância de 5%, pelo programa SAS (Statistical Analysis System).

5. RESULTADOS

Para a realização deste experimento foram utilizadas doses de sêmen congelado, por empresas especializadas, de 4 animais, que pós-descongelção foram submetidos a avaliação da concentração, motilidade e vigor (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação dos espermatozóides pós-descongelção.

Procedimento	Touro			
	1	2	3	4
Concentração (x10 ⁶ /mL)	171,96	90,27	125,63	136,25
Motilidade (%)	50	60	70	60
Vigor	3	3	4	3

5.1. Controle de qualidade dos espermatozóides submetidos ao “swim-up” modificado

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos espermatozóides após o “swim-up” modificado, estão agrupados na Tabela 2. A motilidade, o vigor e concentração dos espermatozóides foram avaliados após a descongelção e após o “swim-up”. A taxa de espermatozóides recuperados do “swim-up” expressa a relação entre o número de espermatozóides submetidos ao “swim-up” e o número de espermatozóides recuperados no sobrenadante, em porcentagem.

Foram submetidos ao método, em média, 35,76 milhões de espermatozóides, com motilidade e vigor de 60-70 e 4-5, respectivamente. Após a realização do “swim-up” foram recuperados em torno de 18,27% (6,53 milhões) dos espermatozóides processados por essa metodologia, com motilidade de 80% e vigor 4-5. Podemos observar que o método de “swim-up” modificado aumentou a motilidade dos espermatozóides, portanto, concluímos que o “swim-up” seleciona os espermatozóides com motilidade elevada.

Tabela 2: Médias obtidas do controle de qualidade dos espermatozóides processados pelo “swim-up”.

Procedimento	“Swim-up”				
	Touro	1	2	3	4
Total de espermatozóides submetidos ao swim-up ($\times 10^6$)	68,67	18,43	31,25	24,68	
Motilidade/Vigor inicial	60/3	70/4	70/5	60/5	
Total de espermatozóides recuperados pós swim-up ($\times 10^6$)	15,00	4,34	4,8	2,00	
Motilidade/Vigor pós swim-up	90/5	75/4	90/5	65/5	
Taxa de Recuperação (%)	21,84	23,55	15,36	8,10	

5.2. Controle de qualidade da centrifugação no gradiente descontínuo de densidade

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos espermatozóides durante a centrifugação, estão agrupados na Tabela 3. A motilidade, o vigor e a concentração dos espermatozóides foram avaliados após a descongelação e após a centrifugação no gradiente de densidade.

Foram colocados sobre a coluna do gradiente descontínuo de densidade, em média, 56,25 milhões de espermatozóides, com motilidade variando entre 60-70% e com vigor 3. A taxa de recuperação de espermatozóides após a centrifugação nos gradientes descontínuos de densidade foi em média 4,15% (2,33 milhões) do total de espermatozóides, colocados sobre o G14, a motilidade espermática foi em média 80% e o vigor 3-4. A centrifugação em gradiente densidade aumenta a seleção de espermatozóides viáveis, o que é comprovado pelo aumento na motilidade espermática observado após a centrifugação.

Tabela 3: Médias obtidas do controle de qualidade de espermatozóides centrifugados em Gradiente Descontínuo de Densidade (G14).

Procedimento Touro	Centrifugação em gradiente			
	1	2	3	4
Total de espermatozóides submetidos a centrifugação ($\times 10^6$)	68,35	30,88	87,06	38,34
Motilidade/Vigor inicial	50/3	60/3	75/4	70/4
Total de espermatozóides recuperados pós centrifugação ($\times 10^6$)	1,30	2,42	4,29	1,34
Motilidade/Vigor pós centrifugação	85/4	85/4	80/3	70/3
Taxa de Recuperação (%)	1,90	7,83	4,92	3,49

5.3. Controle de qualidade do Método do “swim-up” modificado associado a Centrifugação em Gradientes Descontínuos de Densidade

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos espermatozóides durante a centrifugação, estão agrupados na Tabela 4. A motilidade, o vigor e a concentração dos espermatozóides foram avaliados após a descongelação e após o método de associação.

Esse método foi desenvolvido com o intuito de aumentar a seleção de espermatozóides viáveis e aumentar a população de espermatozóides portadores do cromossomo X. Foram submetidos a essa metodologia 86,84 milhões de espermatozóides, em média, com motilidade e vigor, respectivamente, 60% e 3. A taxa de recuperação de espermatozóides submetidos ao método “swim-up” e logo depois de centrifugados no gradiente descontínuo de densidade foi, em média, 2,63% (2,28 milhões) do total de espermatozóides, a motilidade espermática foi em média 70-80% e o vigor 3-4. Após o uso desta metodologia, foi observado também um aumento na motilidade espermática, concluindo-se que houve uma seleção dos espermatozóides viáveis.

Tabela 4: Médias obtidas do controle de qualidade de espermatozóides submetidos ao método "swim-up" associado a centrifugação em **Gradiente Descontínuo de Densidade (G14)**.

Procedimento	Associação "swim-up"/ centrifugação em gradiente			
	1	2	3	4
Touro				
Total de espermatozóides submetidos na associação (x10⁶)	107,62	56,58	73,79	109,37
Motilidade/Vigor inicial	60/3	60/3	70/3	60/3
Total de espermatozóides recuperados pós associação (x10⁶)	4,68	0,88	1,92	1,67
Motilidade/Vigor pós associação	70/3	90/3	80/4	65/4
Taxa de Recuperação (%)	4,35	1,55	2,60	1,52

5.4. Condição Acrossomal

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e para analisar a condição acrossomal foi utilizada a coloração Azul Tripán/Giemsa, amostras de 20µl foram coradas e a partir delas foram feitos dois esfregaços, nos quais contamos 100 células. A dupla coloração vital Azul de Trypan/Giemsa pode identificar a condição acrossomal de maneira eficiente, pois permite diferenciar a verdadeira reação acrossomal da falsa, uma vez que é possível saber se o espermatozóide está vivo ou morto (KOVACS & FOOTE, 1992).

A partir desta coloração podemos identificar quatro tipos de classes de espermatozóides: a) vivo com acrossoma intacto (VI); b) vivo sem acrossoma (VSA); c) morto com acrossoma intacto (MI); d) morto sem acrossoma (MSA). Na Tabela 8, estão descritas as porcentagens médias das amostras submetidas a coloração de Azul Tripán/Giemsa. Os resultados foram submetidos à análise de variância com 5% de significância.

Tabela 5: Médias das avaliações da condição acrossomal* dos espermatozóides processados pelos seguintes grupos experimentais**

Procedimento	VI	VSA	MI¹	MSA
Controle	9,25 ^a	52,00 ^a	6,38 ^a	32,38 ^a
“swim-up”	9,75 ^a	59,25 ^{ab}	3,25 ^{ab}	23,88 ^{ab}
Gradiente 14	7,00 ^a	71,87 ^{bc}	1,65 ^b	20,00 ^{ab}
SGD	6,38 ^a	79,37 ^c	0,63 ^b	17,88 ^b
Pr > F^{***}	0,2399ns	0,0012s	0,0206s	0,0139s

*Coloração vital de Azul de Tripán e Giemsa

** Controle, “Swim up”, gradiente descontínuo de densidade, “Swim up” associado ao gradiente descontínuo de densidade.

***Análise de variância (Teste Tukey)

Letras minúsculas avaliadas nas colunas

VI: espermatozóide vivo com acrossoma intacto

VSA: espermatozóide vivo sem acrossoma

MI: espermatozóide morto com acrossoma intacto

MSA: espermatozóide morto sem acrossoma

¹ A variável MI foi transformada para $\sqrt{MI + 1}$, para tornar possível a análise de variância.

Como demonstrado na tabela acima, podemos salientar que a variável VI, não teve efeito significativo quando comparada entre os grupos, demonstrando que os procedimentos de separação de espermatozóides mantiveram resultados semelhantes de espermatozóides com membrana íntegra, quando comparados com os espermatozóides corados após a descongelação (grupo controle).

A variável VSA apresentou diferença significativa entre os grupos. O grupo “swim-up” associado ao gradiente de densidade (SGD) apresentou maior porcentagem de espermatozóides vivos sem acrossoma. O mesmo pode ser dito para os outros procedimentos de seleção de espermatozóides.

A quantidade de espermatozóides mortos com acrossoma intacto (MI), reduziu quando comparamos o grupo controle com os outros grupos, apresentando assim diferença significativa entre os tratamentos. A porcentagem de espermatozóides mortos sem acrossoma (MSA), também reduziu quando comparamos o controle, com os outros tratamentos, também resultando em diferença significativa entre os tratamentos.

5.5. Controle de qualidade considerando como parâmetro a produção *in vitro* de embriões

Os resultados referentes à produção *in vitro* (PIV) de embriões estão representados na Tabela 6, na qual indicamos: o número total de oócitos utilizado na PIV, quantos destes oócitos haviam clivado 48 horas após a fecundação (e sua relação com o número total de oócitos, expressa em porcentagem), quantos embriões desenvolveram até blastocisto (e sua relação com o número total de oócitos iniciais, expressa em porcentagem). Os resultados estão apresentados para cada método testado. Os resultados foram analisados pelo Teste do Qui-quadrado, com um grau de significância de 5%.

Os resultados referentes à proporção sexual dos embriões produzidos *in vitro* estão representados na Tabela 7, na qual indicamos: o número total de embriões sexados por PCR o número de embriões machos (expresso em porcentagem) e o número de fêmeas (expresso em porcentagem). Estes resultados estão apresentados para cada método testado. Os resultados foram analisados pelo Teste Qui-quadrado, com um grau de significância de 5%.

Com relação às taxas de clivagem (Tabela 6) não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$), o mesmo ocorreu com as taxas de blastocisto, portanto podemos afirmar que as metodologias empregadas para a seleção de espermatozóides não afetam as taxas de desenvolvimento embrionário.

Os embriões fecundados com espermatozóides selecionados pelos métodos de seleção espermática, descritos na Tabela 7, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) no desvio da proporção sexual dos embriões produzidos *in vitro*. Mas observamos uma diferença numérica entre os métodos utilizados para seleção espermática e o grupo controle. O grupo de oócitos fertilizadas com espermatozóides processados pelo “swim-up” produziu 61,84% de fêmeas, a centrifugação em gradiente de densidade apresentou um desvio para fêmeas de 59,55% e a associação dos dois métodos promoveu um desvio de 60,57% para fêmeas. Já o grupo controle apresentou 45,20% de fêmeas.

Tabela 6: Controle de qualidade da produção *in vitro* de embriões considerando como parâmetros as taxas de clivagem e de blastocisto.

Procedimento	Taxa de clivagem (%/embriões clivados)	Taxa de blastocisto (%/blastocistos produzidos)
Controle	71,71(1445)	25,93 (522)
“swim-up”	72,94 (186)	32,55 (83)
Gradiente 14	70,50 (282)	27,5 (110)
SGD	67,4 (244)	20,17(73)
Total de oócitos utilizados		3032

Tabela 7: Verificação do desvio proporção sexual pela utilização de espermatozóides sexados na produção de embriões *in vitro*.

Procedimento	Machos (%/embriões machos)	Fêmeas (%/embriões fêmeas)
Controle	54,80 (234)	45,20 (193)
“swim-up”	38,16 (29)	61,84 (47)
Gradiente 14	40,55 (36)	59,55 (53)
SGD	39,43 (28)	60,57 (43)
Total de embriões sexados pela PCR		663

6. DISCUSSÃO

Nessa dissertação descreveu-se a produção de amostras de sêmen enriquecidas com espermatozóides portadores do cromossomo X após centrifugação em gradiente descontínuo de densidade associado ou não ao “swim-up”.

6.1. Aspectos técnicos da centrifugação em gradientes descontínuos de densidade associados ou não ao “swim-up”

A viabilidade espermática demonstrada nas Tabelas 1 a 8 deve-se ao fato de que os protocolos desenvolvidos nesse trabalho visaram manter a qualidade espermática e, para tanto, foi considerado que a viabilidade e função dos espermatozóides, durante a manipulação para a seleção do sexo, dependeriam do meio extracelular, particularmente de sua composição iônica como relatado por FRASER (1995) e a qualidade do sêmen antes da centrifugação. Por isso, efetuou-se a escolha dos touros pela análise dos resultados de qualidade do sêmen após a descongelamento: motilidade, vigor, concentração, patologia, aspecto do diluidor.

Os meios de cultura tinham componentes como glicose e albumina sérica bovina que associadas ao pH, a osmolaridade, a temperatura, o tempo de centrifugação e a força centrífuga permitiram manter a viabilidade dos espermatozóides de forma que os mesmos fossem resistentes aos procedimentos experimentais e mantivessem a viabilidade (motilidade, vigor, % de acrossoma intacto, taxa de produção de embriões *in vitro*). Além disso, utilizou-se gradiente composto de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias compostas de partículas coloidais ou componentes iodinados que permitem em uma única centrifugação, separar as impurezas (partículas leves, espermatozóides imaturos, células, bactérias) dos espermatozóides viáveis (que se localizaram na fração mais densa e inferior do tubo de centrifugação; (DE LA CALLE, 1991; NICHOLSON, et al., 2000) e, dentre estes, separar os espermatozóides X. A seleção dos touros associada à diminuição do número de centrifugações permitiu

diminuir as injúrias causadas nos espermatozóides pelos procedimentos utilizados para a retirada do diluidor, por exemplo a lavagem, como preconizado por AITKEN & CLARKSON (1995) e igualmente observado por ZINI et al. (2000) na espécie humana.

O pH estabilizado em 7,4 associado à presença de glicose preveniu reação acrossomal (PARRISH et al., 1985; PARRISH et al., 1988) além daquela provocada pelo processo de congelação e descongelação.

O meio de cultura DMEM e as soluções de Percoll e Optiprep foram preparadas de modo que a osmolaridade ficasse entre 290 a 330 mOsm/kg H₂O para evitar o estresse osmótico e, assim, mantivessem a viabilidade (GUTHRIE et al., 2002). Essa osmolaridade foi maior que a média de 263 e 274mOsm/Kg de H₂O no primeiro e segundo saltos, respectivamente (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998).

Muitos autores que trabalharam na separação de espermatozóides através de gradientes de densidade de Percoll negligenciaram a importância da osmolaridade. Os espermatozóides são constituídos por 50% de água, sendo considerado uma célula osmoticamente ativa, e quando submetida a soluções hipotônicas, a água entra no citoplasma promovendo um equilíbrio osmótico. Conseqüentemente o volume espermático aumenta e a membrana plasmática torna-se espessa. Quando submetidos a soluções hipertônicas, há uma redução no seu tamanho, acompanhada de alterações morfológicas (BERGER et al., 1985, AKERLOF et al., 1987). Essas modificações tornam a membrana dos espermatozóides mais susceptíveis aos danos causados pela centrifugação (DE LA CALLE, 1991), por isso a osmolaridade é essencial para uma ótima separação de células através de gradiente de Percoll (VICENT & NADEAU, 1984).

6.2. Taxa de recuperação e viabilidade dos espermatozóides após os tratamentos

6.2.1. “Swim-up”

A taxa média de 18,27% (6,53 milhões) de recuperação dos espermatozóides processados pelo “swim-up” foi semelhante às aquelas relatadas por PARRISH et al. (1995) e CORREA et al. (1997), utilizando sêmen congelado recuperaram em média 6,8 e 1,9 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva de 80% e 85%, respectivamente. Já SAMARDZIJA et al. (2007), recuperou 20 milhões de espermatozóides, com motilidade progressiva de 53%.

Com a utilização deste método, a recuperação espermática pode ser baixa, quando comparado com outras técnicas de seleção de espermatozóides (ZAVOS, 1992), o que não corrobora com os resultados obtidos no presente experimento. A recuperação dos espermatozóides através do “swim-up” pode ser afetada por dois fatores: 1) o volume do meio de cultura sobreposto aos espermatozóides é grande em relação ao tamanho do sedimento de onde os espermatozóides migram; 2) a área de contato entre o espermatozóide e o meio de cultura é muito pequena, o que dificulta a migração do espermatozóide para o meio de cultura (MAKLER et al., 1984).

O aumento na motilidade, que após a descongelação era de 60 a 70%, para 80% também é uma característica do “swim-up” já descrita na literatura (PARRISH et al., 1995; CORREA et al., 1997). O aumento da motilidade e vigor deve-se ao fato do “swim-up” ou Migração espermática ser um método baseado na capacidade dos espermatozóides móveis migrarem do sedimento formado após centrifugação, para um meio de cultura enriquecido sobreposto a ele (ZAVOS, 1992). Assim, o “swim-up”, originalmente foi desenvolvido para obter amostras de espermatozóides com elevada motilidade, sendo um método que imita as condições *in vivo*, onde somente espermatozóides com alta motilidade migram através de fluidos da cervix e do oviduto, para alcançar o local da fecundação (MORTIMER & MORTIMER, 1992; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997). Nessa dissertação testamos a eficiência do “swim-up” na

separação de espermatozóides portadores do cromossomo X daqueles portadores do Y (item 6.4.1).

6.2.2. Centrifugação em gradiente descontínuo de densidade

Em média, recuperou-se 4,65% do total de espermatozóides processados no gradiente o que corresponde a cerca de 35% menos quando comparado com a centrifugação em gradiente de densidade utilizando sêmen *in natura* (média de 12%). Essa diminuição pode estar relacionada à utilização de espermatozóides descongelados que foram depositados diretamente sobre o gradiente coluna de Percoll™ ou Optiprep. Provavelmente, esses espermatozóides apresentavam vários graus de lesão sofrida durante o processo de congelação. Como o gradiente permite a passagem apenas dos espermatozóides viáveis, a taxa de recuperação foi diminuída (AITKEN & CLARKSON, 1995). Esse pressuposto foi reforçado pelo fato de que após a centrifugação obtivemos um aumento de 10 a 20 % nos valores de motilidade quando comparamos com os valores antes da centrifugação.

6.2.3. Centrifugação em gradiente descontínuo de densidade associado ao “swim-up”

Alternativamente, associou-se à centrifugação o “swim-up” na tentativa de aumentar a acuidade de separação dos espermatozóides X.

Até o momento, não foram encontrados na literatura protocolos de sexagem de espermatozóides bovinos utilizando centrifugação no gradiente de densidade descrito, bem como sua associação ao “swim-up”.

A taxa de recuperação de espermatozóides submetidos ao método “swim-up” e logo depois de centrifugados em gradiente descontínuo de densidade, 2,63% (2,28 milhões) do total de espermatozóides, a motilidade espermática foi em média 70-80% e o vigor 3-4. Essa recuperação ficou aquém daquela desenvolvida para espermatozóide humano em que associou o “swim-up” ao gradiente de Percoll, constituído de duas

camadas (45%/90%), para seleção de espermatozóides viáveis. A taxa de recuperação foi em média 43%, do total de espermatozóides submetidos ao método de associação, e a motilidade espermática 60% (CHEN et al., 1996).

Mesmo com as perdas espermáticas, a taxa de recuperação média de 4,65% processa por hora mais espermatozóides que a citometria de fluxo, que é a técnica utilizada comercialmente. Para exemplificar, há dados da literatura que demonstram que, por citometria de fluxo, é necessária uma hora para se produzir 18 milhões de espermatozóides X com pureza de 75% (JOHNSON & WELCH, 1999; JOHNSON, 2000) mas com viabilidade comprometida. Cinquenta por cento deles possuem algum tipo de dano cromossômico (LIBBUS et al., 1987) ou danos no mRNA (MORTON et al., 2007).

Utilizando a técnica objeto da presente dissertação pode-se produzir por cada tubo de gradiente a média de 4 milhões (considerando todos os tratamentos). Como a cada centrifugação tinha-se capacidade para 40 tubos, então produzíamos a cada hora 160 milhões de espermatozóides com pureza de 60%. Portanto, o número de espermatozóides processados dependeu da capacidade da centrífuga (número de tubos por centrifugação) e do número de centrífugas. Assim, a quantidade de doses de sêmen produzidas pode ser largamente ampliada com investimento mais baixo (compra de centrífuga).

6.3. Condição Acrossomal

A porcentagem de espermatozóides vivos em cada amostra de sêmen representou a condição do acrossoma (representado pela classe VI), considerada a característica mais importante para o processo de fecundação (PARRISH et al., 1988; COSTA, 2002).

Apesar de todos os tratamentos utilizados nesta dissertação, selecionarem maior quantidade de espermatozóides vivos, eles promovem a reação acrossomal. Pôde-se explicar esse fato fazendo-se a seguinte análise. As porcentagens de 9,25% de espermatozóides VI, 52,00% de espermatozóides VSA e 38,76% de espermatozóides

mortos logo após a descongelação corroboraram com WATSON (2000), que relatou que os processos de congelamento e descongelamento causam danos na membrana e pode causar a reação acrossomal. Assim, desenvolver um método para sexar espermatozoides descongelados deve levar em conta a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto (presença de acrossoma íntegro) já que essa classe é muito importante para o processo de fecundação (PARRISH et al., 1988; COSTA, 2002).

O “swim-up”, é um método de capacitação espermática muito utilizado para seleção de espermatozoides destinados a PIV de embriões bovinos, e também para seleção de espermatozoides em humanos para processos de reprodução assistida. Os espermatozoides bovinos, descongelados, submetidos a esse método apresentaram 9,75% de espermatozoides VI e 59,25% de espermatozoides VSA, demonstrando que o “swim-up”, aumenta o número de espermatozoides que sofreram a capacitação espermática. A porcentagem de espermatozoides mortos encontrados foi em torno de 27,13%, assim, podemos afirmar que esse método é capaz de selecionar espermatozoides vivos com eficiência, como descrito por RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. (1997) e BOTTCHEER-LUIZ (1996).

Com a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade houve aumento na porcentagem de espermatozoides VSA, 71,85%, indicando que o método promoveu a capacitação espermática, mas seleciona com eficiência os espermatozoides vivos. O fato da maioria dos espermatozoides sofrerem a reação acrossomal após a centrifugação em gradiente não afetou a fertilidade dos espermatozoides pois as taxas de clivagem e blastocistos foram semelhantes às taxas obtidas no grupo controle. O processo de centrifugação aumentou a porcentagem de espermatozoides com a membrana danificada.

Quando centrifugou-se em gradiente de densidade sêmen *in natura*, obteve-se em média 25,13% de espermatozoides vivos (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005), Com base nesses resultados, podemos constatar que a utilização de sêmen congelado para a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade, só é recomendada quando os espermatozoides recuperados forem utilizados imediatamente para a PIV, pois o

processo de criopreservação já causa danos de membrana (WATSON, 2000) assim como a centrifugação em gradiente. Por isso, a capacitação durante o processo de sexagem, seria uma limitação para congelação dos espermatozóides.

Quando associamos ao “swim-up” a centrifugação em gradiente de densidade, observamos um aumento na porcentagem de espermatozóides vivos sem acrossoma, 79,38%, o que mostra que esse procedimento tem maior habilidade de selecionar espermatozóides vivos, mas resulta na capacitação de um maior número de espermatozóides.

Os resultados são semelhantes aqueles após a sexagem utilizando sêmen in natura por citometria de fluxo (JONHSON, 2000). Como apenas 65% dos espermatozóides apresentavam acrossoma intacto (ZHANG et al., 2003) haveria uma vantagem se esses espermatozóides fossem utilizados imediatamente após a separação para fazer PIV, dispensando a indução da capacitação antes da fertilização.

Muitas técnicas de coloração têm sido usadas para se determinar a porcentagem de espermatozóides que sofreram reação acrossomal (RA) e, apesar de serem utilizadas com relativo sucesso na detecção dos diferentes estágios da RA apresentam as seguintes desvantagens: a) não permitem diferenciar a verdadeira ou falsa RA; b) não permitem a avaliação de espermatozóides vivos ou mortos; c) necessitam de microscópio e equipamentos especializados (KOVÁCS & FOOTE, 1992).

A utilização da microscopia eletrônica é descrita como sendo o melhor método para a determinação da condição da reação acrossomal, porém sua utilização é limitada devido à necessidade de equipamento de elevado custo e da utilização de técnicos treinados (ZEGINIADOU, 2000).

Os métodos que utilizam microscopia de contraste de fase (SAACKE & MARSHAL, 1968) e interferência de fase (STEINHOLT et al., 1991) podem trazer dificuldades ao avaliar as alterações acrossomais em espermatozóides com elevada motilidade (DIDION et al., 1989).

Assim sendo, muitas técnicas de coloração têm sido usadas para se determinar a porcentagem de espermatozóides que sofreram reação acrossomal, como por exemplo, as que empregam os corantes Naphtol Yellow S/Erythosin B (LENZ et al., 1983;

STEINHOLT *et al.*, 1991), Bismarck Brown/Rosa Bengala, Azul de Trypan/Giemsa (DIDION *et al.*, 1989; KOVÁCS & FOOTE, 1992; SANCHEZ *et al.*, 1995, WAY *et al.*, 1995) e Chicago sky Blue (KÚTVÖLGYI *et al.*, 2006). Técnicas de fluorescência que utilizam lecitinas ou mesmo anticorpos específicos podem também ser utilizadas com sucesso na detecção dos diferentes estágios da reação acrossomal, pela utilização da microscopia de fluorescência ou mesmo pela utilização da citometria de fluxo, porém necessitam de microscópios e equipamentos especializados (ZEGINIADOU, 2000). Por outro lado, algumas técnicas que avaliam a porcentagem de espermatozoides vivos, como por exemplo a coloração supravital com eosina-Y, recomendada pela Organização Mundial de Saúde para análise na espécie humana, não permitem uma análise precisa da condição acrossomal (MING-HUEI *et al.*, 1998).

Além disso, mostrou-se ser possível a avaliação da integridade da membrana plasmática e da condição acrossomal dos espermatozoides descongelados oriundos do epidídimo e do ejaculado de touros, utilizando dupla coloração (Azul de Trypan e Giemsa) sem a prévia indução da reação acrossomal com Heparina e LPC e classificando quatro classes de espermatozoides: vivos íntegros, vivos reagidos, mortos íntegros e mortos reagidos (DIAS, 2002). Assim como o autor, consideramos que os danos causados pelos processos de centrifugação e criopreservação induziriam a reação acrossomal (TARÍN & TROUNSON, 1994; BAILEY *et al.*, 2000) que apenas foi relevada com a coloração.

Concordamos com KOVÁCS & FOOTE (1992), que as demais técnicas têm suas vantagens, porém, nenhuma delas cora os espermatozoides vivos para identificar reação ou danos que podem ocorrer no acrossoma dos espermatozoides descongelados, inerentes a congelação e não à preparação da amostra para análise, pré-dizendo, a viabilidade fecundante, permitindo assim, a liberação da partida do sêmen a ser usado para inseminação artificial.

6.4. Produção *in vitro* de embriões e desvio da proporção sexual

O sistema de cultivo de embriões utilizado no presente experimento, seguiu as recomendações de VAJTA et al. (1999), no qual o soro fetal bovino (SFB) é substituído pelo BSA, no meio de cultivo *in vitro*, com o intuito de não promover o desvio da proporção em favor dos machos.

As taxas de clivagem e blastocistos obtidas foram satisfatórias, apesar dos embriões serem cultivados em meio sem SFB. O cultivo *in vitro* foi feito em placa de 4 poços ao invés de microgotas, dispensando a substituição do meio de cultivo (“feeding”), o que diminui o metabolismo embrionário, induzindo o uso de reservas endógenas, segundo hipótese de LESSE (2000). Portanto podemos afirmar que as metodologias empregadas para a seleção de espermatozóides não afetam as taxas de desenvolvimento embrionário.

6.4.1. “Swim-up”

O “swim-up” é um método de separação de espermatozóides muito utilizado na produção *in vitro* de embriões bovinos, assim como o gradiente de Percoll (45%/90%), para a seleção dos melhores espermatozóides capazes de fertilizar oócitos. Utilizando o método “swim-up” descrito por IRIANNI et al. (1990) para a produção *in vitro* de embriões bovinos, obtivemos, em média, 72,94% de embriões clivados e 32,54% de blastocistos produzidos. No grupo controle as taxas de clivagem e blastocistos foram 71,71% e 25,93%, respectivamente. Embora não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, podemos observar que no grupo, em que, os oócitos foram fertilizados por sêmen processados pelo “swim-up”, houve melhor desenvolvimento embrionário, quando comparado com todos os outros métodos, inclusive o grupo controle (Tabela 9).

PARRISH et al. (1995), utilizou o método “swim-up” para selecionar espermatozóides viáveis para a produção de embriões, as taxas de clivagem e

blastocistos obtidas por ele foram em média, 60% e 17% respectivamente. Já WALTERS et al. (2004) obtiveram taxa de clivagem de 54% e 1,5% de blastocistos.

RHEIGANTZ et al. (2002), também utilizando o método do “swim-up” para a produção *in vitro* de embriões, observaram taxas de clivagem de 84,6% e 39,9% de blastocistos produzidos. SAMARDZIJA et al. (2007), submetendo espermatozóides descongelados ao método de “swim-up”, para a produção *in vitro* de embriões, obteve taxas de clivagem em torno de 70% e taxas de blastocistos em torno de 20%.

Considerando-se que o espermatozóide portador do cromossomo X é maior que o espermatozóide portador do cromossomo Y, ou seja, o espermatozóide X possui mais DNA que o Y, existe uma diferença na velocidade de movimentação entre eles, sendo o Y mais veloz que o X (MADRID-BURY et al., 2003). Com base nesta consideração alguns autores concluíram que o meio sobreposto ao sedimento está enriquecido com espermatozóides Y (CHECK et al., 1994, CHECK & KATSOFF, 1993). Mas existem resultados contraditórios, DE JONGE et al. (1997) e MADRID-BURY et al. (2003) não encontraram diferença entre a porcentagem de espermatozóides X e Y, após o método de “swim-up”.

Já BOTCHER-LUIZ et al. (1997) encontraram 30,44% de espermatozóides portadores do cromossomo Y, no meio sobreposto ao sedimento após 1 hora de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. Os resultados de BOTCHER-LUIZ et al. (1997) são semelhantes ao encontrado neste experimento, o desvio da proporção sexual para fêmeas foi de 61,80%, sendo contraditórios com autores citados anteriormente.

RHEIGANTZ et al. (2004), com o objetivo de avaliar a proporção sexual de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com a utilização de espermatozóides selecionados pelo método “swim-up”, os embriões foram cultivados em meio contendo ou não glicose, e no estágio de 8 células o desvio da proporção sexual para o meio contendo glicose foi de 20,6% de fêmeas, já para o meio de cultivo sem a glicose a proporção de fêmeas foi de 37,5%. O que demonstra que o meio enriquecido com glicose, favorece o desenvolvimento de embriões machos.

6.4.2. Gradiente Descontínuo de Densidade

As taxas de clivagem e blastocistos, 70,50% e 27,59%, respectivamente, foram superiores aquelas descritas por BLOTTNER et al. (1993), de 53,40% e 20,2%, respectivamente (com 515 oócitos), utilizando centrifugação em gradiente de Percoll, com o intuito de sexar espermatozóides bovinos. Da mesma forma, HOSSEPIAN DE LIMA et al. (2003), utilizando sexagem de espermatozóides por gradiente descontínuos de densidade, observaram taxas de clivagem de 75% e de desenvolvimento embrionário de 30%, com acuidade de sexagem de até 70%.

Em bovinos, na literatura, foram encontrados apenas esses dois trabalhos, como um relato de produção *in vitro* de 20 embriões com espermatozóides enriquecidos por centrifugação em gradiente de densidade (BLOTTNER et al., 1993). Estes embriões foram sexados por PCR verificando-se 90% de fêmeas. Estes resultados foram superiores aos do presente projeto como indica a Tabela 10. Entretanto, estes 20 embriões foram produzidos com apenas uma partida de espermatozóides enriquecidos e em apenas uma sessão de FIV. Como se demonstrou nessa dissertação foram realizadas 3 sessões de PIV, o sexo genético dos embriões foi determinado por PCR, verificando-se 59,55% de fêmeas. Assim, considerou-se que a acuidade de desvio da proporção sexual dessa dissertação foi mais consistente do que aqueles encontrados na literatura.

Independente do número de embriões produzidos as taxas de clivagem e de blastocisto utilizando espermatozóides centrifugados em gradiente de densidade foram superiores aquelas utilizando sexagem por citometria de fluxo. Apesar da acuidade de sexagem atingir até 87% as taxas de blastocistos entre 10 e 31% (LU et al., 1999; WILSON et al., 2006; PUGLISI, et al., 2006; MORTON et al., 2007) podem produzir menos fêmeas nascidas quando comparado com outra técnica em que a acuidade atingiu 65% e a taxa de blastocisto foi de 27%. Isso pode ser explicado pois apesar de relatos de 31% de blastocistos, constatou-se danos causados na expressão gênica (mRNA) dos mesmos (MORTON et al., 2007). Esses danos podem provocar a morte

embrionária por ocasião da implantação devido a alterações no genoma paterno (VAN GOLDE et al., 1999).

Nesta dissertação não foram avaliados os danos no DNA antes ou após a centrifugação nos gradientes de densidade, já que a literatura relata que, apesar de algumas vezes esse procedimento aumentar em 3,5% os danos no DNA (ZINI *et al.*, 2000), na maioria das vezes preservam o material genético e ainda é capaz de selecionar, os espermatozóides com o DNA íntegro, em pacientes de boa qualidade. (SAKKAS et al., 2000; TOMLINSON et al., 2001).

O método de centrifugação de espermatozóides descongelados em gradiente descontínuo de densidade, desviou a proporção sexual para fêmeas para até 61% . BLOTTNER et al. (1993), produzindo embriões *in vitro* com sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade, sendo o sexo dos embriões determinados por PCR, verificou-se 90% de fêmeas.

Esse desvio na proporção sexual dos embriões produzidos *in vitro* para fêmea poderia ser maior, pois o grupo controle (espermatozóides processados em gradiente de Percoll 45%/90%) apresentou um desvio na proporção sexual para machos, 54,80%. Concluimos que o sistema da produção *in vitro* de embriões, mesmo seguindo o protocolo de VAJTA (1999), promoveu desvio da proporção sexual para machos. Uma hipótese seria com relação ao tempo de maturação (maior que 22h) aumentaria a proporção de machos (AGUNG et al., 2006) e também o período de incubação oócito-espermatozóide (IWATA et al., 2007).

6.5. Impacto na intensidade de seleção e taxa de reposição

A seleção de espermatozóides portadores do cromossomo X é muito importante, principalmente em sistemas de produção de leite. Utilizando sêmen enriquecido com espermatozóides X em rebanhos leiteiros aumenta o número de fêmeas disponíveis para reposição, e até mesmo para aumento do rebanho, conseqüentemente, da produção.

Para a o teste de progênie, onde o valor genético do touro é mensurado a partir do desempenho produtivo de suas filhas (NORMAN, 2003), o desvio da proporção sexual para fêmeas também é muito importante pois aumentaria o número de filhas nascidas de um mesmo touro para serem avaliadas, aumentando assim a acurácia de predição do touro em teste de progênie.

Como um exemplo, considerando-se um sistema de produção de leite, com 1000 fêmeas lactantes, no qual se utiliza inseminação artificial com sêmen convencional, com uma taxa de gestação de 71% (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005), pode se produzir 710 bezerros (355 machos e 355 fêmeas). Destas 355 fêmeas produzidas, 213 seriam selecionadas para reposição do rebanho (taxa de reposição de 60%), o que daria uma intensidade de seleção de fêmeas de 0,64 (valores encontrados em tabela de distribuição normal). Utilizando a sexagem em gradiente de densidade com 73% de acuidade e 75% de taxa de gestação, pode se produzir 548 fêmeas das quais 213 seriam selecionadas, resultando em uma taxa de reposição de 40% e intensidade de seleção de 0,97. O aumento na intensidade de seleção pode resultar em aumento no ganho genético anual, pela seleção de fêmeas. HOSSEPIAN DE LIMA (2005), utilizando sexagem de espermatozoides por centrifugação em gradiente de densidade (acuidade de 73%), obteve 75% de taxa de gestação e de 71% quando os animais foram inseminados com sêmen convencional. Assim, em 100 vacas inseminadas com sêmen sexado, obteve 55 fêmeas e no grupo controle obteve 36 fêmeas. A sexagem de espermatozoides por centrifugação em gradiente de densidade produziu 19 fêmeas a mais que o grupo controle.

Considerando-se o dado de 60% de produção de fêmeas dessa dissertação e a taxa de prenhez de 75% obtida por HOSSEPIAN DE LIMA, 2005 (já que refere-se a mesma metodologia de sexagem de espermatozoides) e projeta-se para 1000 vacas inseminadas temos a produção de 450 fêmeas e 300 machos. Para se obter o mesmo número de fêmeas para reposição (213 fêmeas), a taxa de reposição diminuiria de 60% para 47% e a intensidade de seleção das fêmeas aumentaria de 0,64 para 0,8. O aumento da intensidade de seleção, conseqüentemente, promove o aumento do ganho genético anual.

Estabeleceu-se uma comparação entre os métodos descritos acima e alguns resultados da literatura que utilizaram sêmen sexado por citometria de fluxo, com uma acuidade de 85% (Tabela 8). Observou-se que, quando a inseminação artificial era feita com sêmen processado em gradiente de densidade (presente experimento; HOSSEPIAN DE LIMA, 2005) a taxa de reposição de fêmeas diminuiu e a intensidade de seleção aumentou. Nos trabalhos em que se utilizou sêmen sexado por citometria de fluxo, a taxa de reposição permaneceu a mesma ou aumentou, mantendo ou reduzindo a intensidade de seleção. Esse fato pode ser explicado pois este método de sexagem reduz a eficiência reprodutiva, o que pode ser comprovado pelas baixas taxas de gestação; já o método de sexagem por gradiente de densidade não altera a eficiência reprodutiva do rebanho, quando comparado com inseminação artificial com sêmen convencional.

Tabela 8: Cálculo da taxa de reposição e intensidade de seleção, para fêmeas, com base em valores de proporção sexual e taxa de gestação, encontrados no presente experimento e na literatura, assumindo um rebanho com 1000 vacas em reprodução.

Autor	Sêmen utilizado	Acuidade do método	Taxa de Gestação	Nº de fêmeas nascidas	Fêmeas para reposição	Nova taxa de reposição	Intensidade de seleção
Presente experimento	Convencional	50%	71%	355	213	60%	0,64
	Sexado	60%	75%	450	213	47%	0,8
Weigel (2004)	Convencional	50%	58%	290	174	60%	0,64
	Sexado	85%	31%	264	174	66%	0,64
Hossepian de Lima (2005)	Convencional	50%	71%	355	213	60%	0,64
	Sexado	73%	75%	548	213	40%	0,97
Andersson et al. (2006)	Convencional	50%	48%	240	144	60%	0,64
	Sexado	85%	21%	178	144	80%	0,35
Wilson et al. (2005, 2006)	Convencional	50%	40%	200	120	60%	0,64
	Sexado	85%	22%	187	120	64%	0,64

Em um teste de progênie de touros jovens, que estão sendo selecionados como pais de touros da próxima geração, em rebanhos destinados à produção de leite, com o uso de inseminação artificial com sêmen convencional em 50 vacas, com taxa de prenhez de 71%, um único touro consegue produzir 18 filhas. Se utilizarmos um método de seleção do sexo de espermatozóides com acuidade de 60% para produção de fêmeas com taxa de gestação de 75%, um touro conseguiria produzir 22 filhas. Com a utilização de um método de sexagem com acuidade de 73% e taxa de prenhez de 75% (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005) seriam produzidas 27 filhas deste touro. Aumentando o número de filhas deste touro, pode haver um aumento na acurácia de predição, o que pode aumentar o ganho genético para a produção de leite.

Na Tabela 9 estão descrito os valores de acurácia de predição calculados com base na seguinte fórmula:

$$r_{AA} = \sqrt{\frac{n \times h^2}{1 + (n-1) \times h^2/4}}$$

A partir dos resultados obtidos observou-se que houve diferença na acurácia de predição de touros, principalmente quando comparamos o sêmen sexado por citometria de fluxo e o sêmen sexado por gradiente de densidade.

A seleção de espermatozóides X é muito importante em teste de progênie de touros jovens, pois quanto maior o número de filhas produzidas maior o número de informações coletadas daquele determinado touro, com isso pode-se determinar mais rapidamente se o touro transmite ou não suas características produtivas para a sua progênie. Sendo, também, muito importante, para a redução de custos do teste de progênie, pois pode-se reduzir o número de vacas utilizadas nos acasalamentos, utilizando sêmen sexado pode-se obter o mesmo número de fêmeas nascidas quando se utiliza sêmen convencional na IA, com menor número de vacas inseminadas.

Tabela 9: Calculo da acurácia de predição de um touro com base no número de filhas nascidas a partir de inseminação artificial, de acordo com o método de processamento do sêmen, assumindo um rebanho de 50 vacas.

Autor	Sêmen utilizado	Acuidade do método	Taxa de Gestação	Nº de fêmeas nascidas	Acurácia de Predição
Presente experimento	Convencional	50%	71%	18	0,74
	Sexado	60%	75%	22	0,76
Weigel (2004)	Convencional	50%	58%	15	0,70
	Sexado	85%	31%	13	0,67
Hossepian de Lima (2005)	Convencional	50%	71%	18	0,74
	Sexado	73%	75%	27	0,80
Andersson et al. (2006)	Convencional	50%	48%	12	0,66
	Sexado	85%	21%	9	0,61
Wilson et al. (2005, 2006)	Convencional	50%	40%	10	0,63
	Sexado	85%	22%	9	0,61

Finalizando, observa-se que a utilização de sêmen sexado por gradiente descontínuo de densidade, com acuidade variando de 60 a 73%, pode-se ter taxas de prenhez satisfatórias, muito semelhantes às taxas de prenhez obtidas faz IA com sêmen convencional (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005). Assim é possível a obtenção de maior produção de fêmeas, em relação ao grupo inseminado com sêmen convencional, resultando em um aumento da intensidade de seleção, da acurácia de seleção, que conseqüentemente resulta em um incremento no progresso genético anual. Já com a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo, as taxas de gestação são muito baixas o que resulta em uma redução da intensidade de seleção, na acurácia de predição e conseqüentemente um decréscimo no ganho genético anual.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- a) Em bovinos, espermatozóides provenientes de sêmen congelado, portadores do cromossomo X, podem ser separados por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade, pelo “swim-up” e pela associação “swim-up”/gradiente, com acuidade de 60%.
- b) Foi possível utilizar com sucesso o espermatozóide sexado por centrifugação em gradiente de sexagem, assim como, os espermatozóides separados pelo “swim-up” e pela associação “swim-up”/gradiente, em sistemas de fecundação *in vitro*, sem prejudicar as taxas de desenvolvimento embrionário, e aumentando os valores de motilidade progressiva e vigor.
- c) A acuidade de 60% (média dos métodos de sexagem do presente trabalho), com uma metodologia semelhante que gera 71% de prenhez, produziu maior intensidade de seleção e menor taxa de reposição, quando comparada com a metodologia com 85% de acuidade com taxa de gestação de 21%.

8. REFERÊNCIAS⁴

AGUNG, B.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, R.; WATARI, H.; NAGAI, T. Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, vol. 52, n.1, p.123-127, 2006.

AKERLOF, E.; FREDRICSON, B.; GUSTAFSSON, O.; LUNDIN, A; LUNELL, N.O.; NYLUND, L.; ROSENBORG, L.; POUSETTE, A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. **Journal Andrology**, v. 10, p. 663, 1987.

ALVES, B. C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; TEIXEIRA, C. M.; MOREIRA-FILHO, C. A. Use of primers derived from a new sequence on the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1415-1419, 2003.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestic Animals**, n. 41, p. 95-97, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório Anual, São Paulo, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório Anual, São Paulo, 2005.

⁴ Normalização documentária para produção científica da UNESP: normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023: 2002 da ABNT. São Paulo, 2003. disponível em [:http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalização.pdf](http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalização.pdf).

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J-F.; CORMIER, N. Semen criopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, p.1-7, 2000.

BEKMAN, H.; MEUWISSEN, T.H.E.; OLDENBROEK, J.K. Increasing beef production from dairy cows by implanting embryos from MOET nucleus breeding schemes for beef cattle. **Livestock Production Science**, v.37, p. 271-282, 1994.

BENJAMIN, T.L.; KOHN, B.; BASKER, C.J.; GEORGE, S.; LIVINGSTON, D., **Method for sex determination of mammalian offspring**. US Patent 6,153,373, 28 Nov 2000.

BERGER, T.; MARR, R.P.; MOYER, D.L. Comparison of techniques for selection of motility spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 43, p. 258, 1985.

BEYHAN Z.; JOHNSON, L.A.; FIRST N.L. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. **Theriogenology**, v.52, p.1115-1116,1999.

BLECHER, S. R.; HOWIE, S. L.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1309-1321, 1999.

BLECHER, S.R. **Method for separating sex specific molecules and non-sex specific molecules**. US Patent 5,840,504, 24 Nov., 1998.

BLOTTNER, S.; SCHWERIN, M.; BÖTTCHER, M.; PITRA, C. Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll density gradient. **Archiv für Tierzucht**, v.36, n.2, p.153-162, 1993.

BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; den DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1647-1655, 2005.

BONDIOLI, K. R.; ELLIS, S. B.; PRYOR, J. H.; WILLIAMS, M. W.; HARPOLD, M. M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 95-104, 1989.

BOTCHER-LUIZ, F.; MAGNA, L.A.; FAZANO, F.A.T. Seleção sexual em dois processos de capacitação espermática: percoll e "swim-up". **Reprodução e Climatério**, v. 12, n. 3, p. 141-147, 1997.

BOTCHER-LUIZ, F. **Pré-seleção sexual *in vitro*: comparação entre os métodos de Percoll e Swim up e proposta de nova técnica**. 1996. 72f. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

BRADLEY, M.P. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. **Journal Dairy Science**, v.72, p.3372-3380, 1989.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Sex-related cleavage rate difference in bovine embryos produced *in vitro* is controlled by glucose. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 191, 1996.

CHANDLER, J. E.; WILSON, M. P.; CANAL, A. M.; STEINHOLT-CHENEVENT, H. C. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1021-1034, 1999.

CHECK, J.H.; KATSOFF, D. A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection. **Human Reproduction**, v. 8, p. 211-214, 1993.

CHECK, J.H.; KWIRENK, D.; KATSOFF, D.; PRESS, M.; BREEN, E.; BAKER, A. Male:female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus Percoll preparation of inseminated sperm. **Archives of Andrology**, v. 33, p. 63-65, 1994.

CORREA, J.R.; ZARMAKOUPIIS-ZAVOS, P. N.; ZAVOS, P. M. Quantitative and qualitative of frozen-thawed bovine spermatozoa recovered via a conventional Swim-up and a standardized Swim-up technique. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 267-274, 1997.

COSTA, M. Z. **Utilização da indução da reação acrossomal e taxa de clivagem in vitro como parâmetros para estimar a fertilidade de touros nelore doadores de sêmen**. 2002, 72p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

DE JONGE, C.J.; FLAHERTY, S.P.; BARNES, A.M.; SWANN, N.J.; MATTHEWS, C.D. Failure of mutitube sperm swim-up for sex preselection. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 6, p. 1109-1014, 1997.

DE LA CALLE, J. F. Human spermatozoa selection in improved discontinuous Percoll gradients. **Fertility and Sterility**, v. 56, n. 4, p. 737-742, 1991.

DEMATAWEWA, C.M.B.; BERGER, P.J. Break-even cost of cloning in genetic improvement of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.4, p.1136-1147, 1998.

DENSITY GRADIENT MEDIA. **Applications and products Axis-Shield**. 4 ed. Norway, 2003.

DIAS, D.L. **Estudo morfofisiológico de componentes protéicos para caracterizar diferenças entre espermatozóides do ejaculado e epidídimo, em bovinos**. 2002, 82f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DIDION, B. A. et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, p.51-57, 1989.

EDDY, E.M. Regulation of gene expression during spermatogenesis. **Cell Developmental Biology**, v.9, p.451-457, 1998.

ELLIS, S. B.; BONDIOLI, K. R.; WILLIAMS, M. E.; PRYOR, J. H.; HARPOLD, M. M. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v. 29, p. 242, 1988.

ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. (1986): Nucleic acid probes for prenatal sexing. International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) World Intellectual Property Organization. Publication No. WO 86/07095.

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

ERICSSON, J. R.; LANGEVIN, C. N.; NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, 246:421-424, 1973.

FORD, T.; GRAHAM, J.; RICKWOOD, D. Iodixanol: A nonionic isoosmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 360, 1994.

FRASER, L.R. Ionic control of sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 905-925, 1995.

FUGGER, E. F. Clinical experience with flow-cytometric separations human X- and Y-chromosome bearing sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1435-1440, 1999.

GADELLA, B. M.; VAN GESTEL, R. A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function . **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 307-319, 2004.

GARNER, D.L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA; JOHNSON, L.A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 312-321, 1983.

GRAHAM, J.; FORD, T.; RICKWOOD, D. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of Iodixanol. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 367, 1994.

GUTHRIE, H.D.; JONSHON, L.A.; GARRET, W.M.; WELCH, G.R.; DOBRINSKY, J.R. Flow cytometric sperm sorting: Effects of varying laser power on embryo development in swine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n.1, p.87-92, 2002.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2001.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2004.

HABERMANN, F.A.; WINTER, A.; OLASKER, I.; REICHERT, P.; FRIES, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos Taurus*) by dual colour fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Animal Breeding and Genetic**, v. 122, suppl.1, p. 22-27, 2005.

HASLER, J.F., CARDEY, E., STOKES, J.E., BREDBACKA, P. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, p. 245-264, 2003.

HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p.1295-1308, 1999.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1421-1433, 1999.

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**. BR PI 0300604-2, 17 Jun. 2003.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Controle de qualidade na seleção de espermatozoides de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica coloidal modificada (Percoll[®]) e iodixanol (Optiprep[™])**. 2005, p.214. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 1998. 89f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M., RAMALHO, M.D.T., RODRIGUES, L.H., MALHEIROS, E.B., MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

IRIANNI, F., ACOSTA, A.A, OHENINGER, S., ACOSTA, M.R. Evaluation and preparation of spermatozoa for intrauterine insemination. In: **Human spermatozoa in assisted reproduction**, Baltimore, WILLIAMS & WILKINS, 1990. p. 225-223.

IWATA, H.; SHIONO, H.; KON, Y.; MATSUBARA, K.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, in press, 2007.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.16, p.303-326, 1994.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1323-1341, 1999.

JONHSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.93-107, 2000.

JONHSON, L.A.; ALLEN, C.H.; WESH, G.R.; RENS, W. Comparative flow cytometric sorting efficiency of X- and Y-chromosome bearing sperm from 40 bulls. **Theriogenology**, v.47, p.219, 1997.

JOST, A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. **Philosophy Transfer Royal Society of London Biology Science**, v. 259, n.828, p. 119-130, 1970.

KOVACS, A., FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic and Histochemistry**, London, v.67, n.3, p.119-24, 1992.

KÚTYÖIGYI, G.; STEFLER, J.; KOVÁCS, A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. **Biotechnic and Histochemistry**, v.81, p.109-117, 2006.

LESSE, H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **BioEssays**, v.24, p.845-849, 2002.

LENZ, R. W., et al. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v.28, p.683-690, 1983.

LIBBUS, B. L.; PERREAULT, S. D.; JOHNSON, L. A.; PINKEL, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoescht 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. **Mutation Research**, v. 182, p. 265-274, 1987.

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

LUZ, M. R.; WATANABE, Y. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I.; MAURO, S. M. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; FRANCESCHINI, P. H. Sexing o *in vitro* fertilized bovine embryos by multiplex PCR. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 453-456, 2000.

MADRID-BURY, N.; FERNANDEZ, R.; JIMENEZ, A., PERES-GARNELO, S.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; D LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Effect of ejaculate, Bull, and double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. **Zygote**, v. 11, p. 229-235, 2003.

MAKKAR, G.; Ng H.Y.; YEUNG S.B.; HO, P.C. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 5, p. 796-802, 1999.

MAKLER, A.; MURILLO, O.; HUSZAR, G.; TARLATZIS, B.; DeCHERNEY, A.; NAFTOLIN, F. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. **International Journal of Andrology**, v. 7, p. 61-70, 1984.

MILLER, A.; KOOPMAN, M. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from bovine gene. **Animal Genetics**, v.21, p. 77-82, 1990.

MOREIRA-FILHO, C.A.; RAMALHO, M.D.T.; KIRNZENBAUM, M.; COTINOT, C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 483, 2000.

MORTIMER, D.; MORTIMER, S.T. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 21, p. 517-524, 1992.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-citometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, in press, 2007.

NICHOLAS, F.W. Genetic improvement through reproductive technology. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.205-214,1996.

NICHOLAS, F.W., SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Production**, v. 36, p.3441-3453,1983.

NICHOLSON, C.M.; ABRAMSSON, L.; HOLM, S.E.; BJURULF, E., Bacterial contamination and sperm recovery after preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different *g* forces. **Human Reproduction**, v.15, p.662-666, 2000.

NORMAN, H.D.; POWELL, R.L.; WRIGHT, J.R.; SATTLER, C.G. Timeliness and effectiveness of progeny testing through artificial insemination. **Journal Dairy Science**, v.86, p.1513-1525, 2003.

PARK, Y.S.; KIM, S.S.; KIM, J.M.; PARK, H.D.; BYUN, M.D. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, v.64, p.123-134, 2005.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p. 1171-80, 1988.

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.

POWELL, R.L.; NORMAN, H.D.; SANDERS, A.H. Progeny testing and selection intensity for Holstein bulls in different countries. **Journal Dairy Science**, v.86, p.3386-3393, 2003.

PUGLISI, R.; VANNI, R.; GALLI, A.; BALDUZZI, D.; PARATI, K.; BONGIONI, G.; CROTTI, G.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; ALENDRI, R. *In vitro* fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. **Reproduction**, v.132, p.519-526, 2006.

RAMALHO, M. F. P. D-T. **Proporção de espermatozóides X e Y em DNA extraído de sêmen pela PCR no gene da amelogenina.** 43 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

RAMALHO, M.D.T.; ALVES, B.C.A.; MOREIRA-FILHO, C.A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sexing of murine and bovine embryos by development arrest induced by high titer H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 484, 2000.

RENDEL, J.M.; ROBERTSON, A. Estimation of genetic gain in milk yield by selection in closed herd of dairy cattle. **Journal of Genetics**, v.50, p.1-8, 1950.

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, n.4, p. 312-316, 2002.

RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozóides selecionados por “swim-up” ou gradiente de percoll. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p. 32-39, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.297-308, 1997.

RORIE, R.W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenology**, v.52, p.1273-1280, 1999.

RUVUNA, F.; TAYLOR, J. F.; WALTER, J. P.; TURNER, J. W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1091-1097, 1992.

SAACKE, R. G.; MARSHALL, C. E. Observations on the acrosome cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.16, p.511-514, 1968.

SAKKAS, D.; MANICARD, C.G.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLI, M.; BIZARRO, D.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U. Use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v.15, p. 1112-1116, 2000.

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.4:58, 7p, 2006.

SANCHÉZ, R. et al. Evaluation of acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. **Theriogenology**, v.43, p.761-768, 1995.

SEIDEL Jr., G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm – overview. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1267-1272, 1999.

SEIDEL, G.E. Economics of selecting for sex: the most important genetic tract. **Theriogenology**, v.59, p.585-598, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. A transferência de embriões no mundo. **O EMBRIÃO**, v.18, p.4-6, 2004.

STEINHOLT, H. C.; CHANDLER, J.E.; TIRATO, V. Evaluating acrosome reaction steps with bright field and differential interference contrast microscopy techniques. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 3822-3826, 1991.

TARÍN, J. J.; TROUNSON, A. O. Inducers of the acrosome reaction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p.33-36, 1994.

TAYLOR, St. C.S.; MOORE, A.J.; THIESSEN, R.B. *et al.* Food efficiency in traditional and sex controlled systems of beef production. **Animal Production**, v.40, p.401-440, 1985.

TOMLINSON, M.; MOFFAT, O.; MANICARD, C.G.; BIZARRO, D.; SAKKAS, D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. **Human Reproduction**, v.16, p.2160-2165, 2001.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, p. 939–948, 1999.

VAN VLECK, L. D. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In: BRACKETT, B.G., SEIDEL, G.E., SEIDEL, S.M. (Ed.). **New Technologies in Animal Breeding**. Academic Press, 1981, p.221-242.

VAN VLECK, L. D.; EVERETT R.W. Genetic value of sexed semen to produce dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.59, p. 1802-1807, 1976.

VAN VLECK, L.D. **Selection index and introduction to the mixed model methods**. CRC Press . University of Nebraska, p.480, 1993.

VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E., BRANDFORD OLTENACU, E.A. **Genetics for the animal science**. New York: W.H. Freeman, cap.13, p.287-313, 1987.

VENTELÄ, S.; TAPPARI, J.; PARVINEN, M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. **Molecular Biology of Cell**, v.14, p.2768-2770, 2003.

VICENT, R.; NADEAU, D. Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles. **Analytical Biochemistry**, v. 141, p. 322-328, 1984.

WALTERS, A. H.; EYESTONE, W. E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 4, p. 554-563, 2004.

WANG, H-X.; FLAHERTY, S.P.; SWANN. N.J.; MATTHEWS, C.D. Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. **Fertility and Sterility**, v.61, n.4, p.720-726, 1994.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p.481, 2000.

WAY, A. L.; HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1301, 1995.

WEIGEL, K.A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.87 (E. Suppl.): E120-E130, 2004.

WILMUT, I.; YOUNG, L.; DESOUSA, P.; KING, T. New opportunities in animal breeding and production-an introductory remark. **Animal Reproduction Science**, v.60, n.6, p.5-14, 2000.

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

WILSON, R.D.; WEIGEL, K.A.; FRICKE, P.M.; RUTLEDGE, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; MATTHEWS, D.L.; SCHUTZKUS, V.R. In vitro production of Holstein embryos using sexed sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p. 776-782, 2005.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Molecular Reproduction Development**, v. 5, p. 155-171, 1993.

ZARUTSKIE, P.W.; MULLER C. H., MAGONE M.; SOULES M. R. The clinical relevance of sex selection techniques. **Fertility and Sterility**, v. 52, n. 6, p. 891-905, 1989.

ZAVOS, P.M. Improvements in qualitative/quantitative characteristics of human spermatozoa using the Swim-up method and a new standardized Rise-Kit™ technique. **Molecular Andrology**, v. 4, p. 231-39, 1992.

ZEGINIADOU, T.; PARADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. **Andrologia**, v.32, p.335-343, 2000.

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

ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.; JARVI, K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. **Urology**, v.56, p. 10.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)