

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

**REDUÇÃO DO VOLUME DE PERCOLL PARA SELEÇÃO
ESPERMÁTICA DE SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIELE MISSIO

Uruguaiana

2018

DANIELE MISSIO

**REDUÇÃO DO VOLUME DE PERCOLL PARA SELEÇÃO
ESPERMÁTICA DE SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

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

Orientadora: Dra. Daniela dos Santos Brum

Co-orientador: Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguiana

2018

DANIELE MISSIO

**REDUÇÃO DO VOLUME DE PERCOLL PARA SELEÇÃO
ESPERMÁTICA DE SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

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

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal

Dissertação defendida e aprovada em 02 de março de 2018.
Banca examinadora:

Prof. Dra. Daniela dos Santos Brum
Orientadora
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Prof. Dr. Joabel Tonelotto dos Santos
Instituto Federal Farroupilha – IFFar

Dedico essa conquista aos meus pais, Rosane e Valdecir, que mesmo distantes sempre me fizeram acreditar que todo o esforço do presente será o resultado do futuro.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me dar força nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Rosane e Valdecir e a minha irmã Daiane, que sempre me apoiaram e compreenderam meus momentos de ausência durante a pós-graduação.

Ao meu namorado, Dirvano Donadel, por ser meu porto seguro, me incentivar e apoiar minhas decisões.

A minha orientadora, Daniela dos Santos Brum e meu co-orientador Fabio Gallas Leivas pela orientação, paciência, amizade, ensinamentos e apoio durante a graduação e pós-graduação. Registro minha admiração, carinho, respeito e gratidão a essas pessoas.

Aos meus colegas do PPGCA, especialmente a Cecília e a Hirya, pela convivência e companheirismo durante essa etapa da minha vida. Vocês foram muitos importantes e sou imensamente grata por terem cruzado meu caminho.

Aos professores do PPGCA, especialmente a Francielli Cibin e Fernando Mesquita, pela colaboração nos experimentos e revisão do artigo. Muito obrigada.

A todos os alunos e colegas de iniciação científica que fizeram parte da minha trajetória no Biotech. Obrigada pela ajuda nos experimentos, e por serem constante fonte de aprendizado.

A Universidade Federal do Pampa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e estrutura para realizar mais essa etapa.

Aos colaboradores, Alta Genetics e Frigorífico Marfrig, os quais disponibilizaram material para os experimentos.

Enfim, a todas as pessoas que de uma forma ou outra colaboraram ou torceram por mim. Muito Obrigada.

“... Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...”

Ana Vilela

RESUMO

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

REDUÇÃO DO VOLUME DE PERCOLL PARA SELEÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

AUTORA: Daniele Missio

ORIENTADORA: Dra. Daniela dos Santos Brum

Uruguaiana-RS, 02 de março de 2018.

Na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos são utilizadas diferentes técnicas de seleção espermática, a fim de recuperar o maior número de espermatozoides com boa qualidade e remover componentes do sêmen e diluente. Dentre essas técnicas, a seleção por gradientes descontínuos de Percoll, é a mais utilizada atualmente em laboratórios de PIV de bovinos. Porém essa técnica vem sendo modificada principalmente com o aumento da utilização do sêmen sexado. O sêmen sexado possui características distintas do sêmen convencional, como baixo número de células por dose e baixa motilidade pós-descongelamento. Assim, o desenvolvimento de um método eficiente para a seleção espermática, que aumente a taxa de recuperação sem prejudicar a qualidade dos espermatozoides é essencial. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do volume de Percoll na recuperação espermática, qualidade dos espermatozoides, estresse oxidativo e cinética do desenvolvimento embrionário de embriões bovinos PIV. Palhetas de sêmen convencional ou sexado foram descongeladas a 35° C por 20 s e distribuídas em alíquotas iguais em três diferentes volumes de Percoll: 300 µL de cada gradiente de Percoll (90, 60 e 30%), Controle; 100 µL de cada gradiente de Percoll, P100; e 200 µL de cada gradiente de

Percoll, P200. Qualidade espermática, taxa de fecundação e cinética do desenvolvimento embrionário até 48 horas pós-inseminação foram avaliadas. Para o sêmen convencional, a motilidade, o vigor e a taxa de recuperação foram maiores nos tratamentos P100 e P200 comparado ao Controle ($P < 0,05$), enquanto os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não foram influenciados pelos tratamentos. Para o sêmen sexado, P100 aumentou a velocidade curvilínea, velocidade média da trajetória e amplitude de deslocamento lateral da cabeça ($P < 0,05$). A taxa de recuperação foi maior em P100 do que no Controle e P200 ($P < 0,05$). A formação de ROS foi menor em P100 do que em P200 e Controle, e a atividade SOD foi menor em P100 do que no Controle. As taxas de fecundação e clivagem, momento da primeira clivagem e número de células foram similares entre P100 e Controle ($P > 0,05$). Portanto, o volume de Percoll de 100 μL aumentou a taxa de recuperação espermática sem prejudicar a qualidade dos espermatozoides e desenvolvimento embrionário, permitindo assim, aumentar o número de gotas inseminadas/ dose e diminuir custos.

Palavras Chave: bovino, gradientes de Percoll, taxa de recuperação, qualidade espermática.

ABSTRACT

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

PERCOLL VOLUME REDUCTION FOR SPERM SELECTION OF SEX-SORTED SEMEN IN *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

AUTHOR: Daniele Missio

ADVISOR: Dra. Daniela dos Santos Brum

Uruguaiiana, March 2^{sd}, 2018.

For *in vitro* production (IVP) of bovine embryos, different sperm selection techniques are used to recover the highest number of sperm with good quality and to remove components of the semen and diluent. Among these techniques, the selection by discontinuous Percoll gradients is currently the most used in bovine IVP laboratories. However, this technique has been modified mainly with the increase of the use of sex-sorted semen. The sex-sorted semen has distinct characteristics of conventional semen, such as low number of cells per dose and low post-thaw motility. Thus, the development of an efficient method for sperm selection, which increases the rate of recovery without impairing the quality of sperm is essential. The aim of the present study was to evaluate the effects of Percoll volume on recovery rate, sperm quality, oxidative stress and embryo development kinetics in bovine embryos IVP. Conventional or sex-sorted semen straws were thawed at 35°C for 20 s and distributed in equal aliquots into three different Percoll volume: 300 µL of each Percoll gradient (90, 60, and 30%), Control; 100 µL of each Percoll gradient, P100; and 200 µL of each Percoll gradient, P200. Sperm quality, fertilization rate, and embryonic development kinetics up to 48 h post-insemination were evaluated. For conventional semen, motility, vigor, and recovery

rate improved in the P100 and P200 treatments compared to the Control ($P < 0.05$), whereas reactive oxygen species (ROS) levels, lipid peroxidation, and superoxide dismutase enzyme (SOD) activity were not influenced by treatments. For sex-sorted semen, P100 increased sperm curvilinear velocity, average path velocity, and amplitude of lateral head displacement ($P < 0.05$). Recovery rate was higher in P100 than in the Control and P200 ($P < 0.05$), formation of ROS was lower in P100 than in the Control and P200, and SOD activity was lower in P100 than in the Control. Fertilization and cleavage rates, moment of first cleavage, and cell number were similar between P100 and the Control ($P > 0.05$). Therefore, a Percoll volume of 100 μL increased sperm recovery rate without damage to sperm quality or early embryonic development, allowing to increase the number of inseminated drops / dose and to reduce costs.

Keywords: bovine, Percoll gradients, recovery rate, sperm quality.

LISTA DE TABELAS

Table 1: Mean values (\pm SD) of the characteristics of conventionally processed bull sperm after selection of sperm using 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).....	54
Table 2: Mean values (\pm SD) of sperm motility evaluated by the Sperm Class Analyzer system, in sex-sorted semen, selected with 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).....	55
Table 3: Mean values (\pm SD) of the characteristics of sex-sorted bull sperm after selection with 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).....	56
Table 4: Mean values (\pm SD) of total fertilization (TF), normal fertilization (NF) and kinetics of the development up to 48 h post-insemination (hpi) of embryos produced with sex-sorted semen selected with 300 (Control) or 100 (P100) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH – Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ANOVA – Análise de variância

BCF – Frequência de batimento flagelar cruzado

CCO – Complexo cumulus oócito

CIV – Cultivo *in vitro*

CO₂ – Dióxido de carbono

DAPI – 4',6-Diamidino-2-Fenilindol

DCF – 2'7' Diclorofluoresceína

DCHF-DA – 2'7' Diclorofluoresceína Diacetato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

hEGF – Fator de Crescimento Epidermal humano

hpi – horas após a inseminação

IA – Inseminação Artificial

IVC – *In vitro* culture

IVF – *In vitro* fertilization

IVM – *In vitro* maturation

IVP – *In vitro* production

LH – Hormônio Luteinizante

LIN – Linearidade

MIV – Maturação *in vitro*

PBS – Solução Salina Fosfatada

PIV – Produção *in vitro*

PM – Motilidade progressiva

Psi – medida de pressão

PVP – Polivinilpirrolidona

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SCA – Sperm Class Analyzer

SOD – Enzima superóxido dismutase

ST – Sexing Technologies

STR – Retilinearidade

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

TCM-199 – Meio de cultivo celular 199

UF – Unidades de fluorescência

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

VAP – Velocidade média da trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade linear progressiva

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 História da tecnologia do sêmen sexado.....	18
2.2 Produção de sêmen sexado por citometria de fluxo	20
2.3 Características espermáticas do sêmen sexado	21
2.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos com sêmen sexado	23
2.4.1 Seleção espermática para produção <i>in vitro</i> de embriões	24
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	30
Abstract.....	32
1. Introduction	33
2. Materials and methods.....	34
2.1. Experimental design.....	34
2.2. Sperm selection procedure	35
2.3. Sperm quality parameters assessment	36
2.4. <i>In vitro</i> embryo production (IVP)	38
2.5. Statistical analysis	40
3. Results	40
4. Discussion.....	41
5. Conclusion.....	45
Conflict of interest	45
Acknowledgements.....	45
Reference	46
5. CONCLUSÕES.....	58
6. PERSPECTIVAS	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, importantes biotécnicas reprodutivas foram desenvolvidas e permitiram avanços na produção animal. Entre elas, a inseminação artificial (IA), criopreservação de sêmen e embriões, sincronização do estro, transferência e sexagem de embriões, produção *in vitro* de embriões (PIV), clonagem e sexagem espermática tem incrementado o ganho genético das propriedades, através da seleção de animais superiores e do sexo desejado (Blondin, 2016). Considerando o crescimento da população mundial e consequente demanda por alimentos, estas biotécnicas são excelentes ferramentas para intensificar a produção de proteína animal através do aumento da eficiência reprodutiva. Entre essas biotecnologias, a predeterminação do sexo de animais tem sido o principal objetivo de produtores por gerações, uma vez que fêmeas são essenciais para produção de leite e de novilhas, enquanto os machos são usualmente requeridos para a produção de carne, pois apresentam melhor conversão alimentar e ganho de peso, além de poderem ser destinados para centrais de IA (Espinosa-Cervantes e Córdova-Izquierdo, 2013). Além disso, a possibilidade de escolher o sexo da prole antes mesmo da gestação, ou da produção do embrião, de acordo com as necessidades do rebanho e/ou demanda do mercado, resulta em maior ganho econômico (Wheeler et al., 2006). Neste contexto, o uso do sêmen sexado em associação com outras biotécnicas reprodutivas representa um avanço na pecuária, permitindo a predeterminação do sexo da prole, otimização da produção e aumento da lucratividade de ambos os rebanhos, de carne e leite (Morotti et al., 2014). O sêmen sexado vem sendo amplamente e cada vez mais utilizado no país, especialmente para a IA e PIV, sendo que o aumento da PIV em bovinos leiteiros foi primariamente suportado pela disponibilidade comercial de sêmen sexado (Pontes et al., 2010; Sartori et al., 2016). Conforme Xu et al. (2009) a PIV pode ser eficientemente implantada para produzir animais do sexo desejado, aumentar o plantel e realizar uma rápida reposição genética. Apesar de não haver disponibilidade de dados sobre a comercialização de sêmen sexado no Brasil, Sartori et al. (2016) afirmam que na PIV, há uma redução na produção de embriões utilizando sêmen sexado comparado ao convencional (23,6% vs. 28,5%; $P < 0,01$) sendo os dados coletados em um dos principais laboratórios no Brasil e compatíveis com outros relatos da literatura. Esses resultados menores de fertilidade podem ser oriundos do processo de sexagem da célula espermática (Garner e Seidel, 2008), o qual influencia em várias características

morfofuncionais dos espermatozoides (Boe-Hansen et al., 2005). Além disso, o reduzido número de espermatozoides por palheta pode contribuir com o impacto negativo na fertilidade quando o sêmen sexado é utilizado (Trigal et al., 2012). Nesse sentido, o desenvolvimento de um método eficiente para a seleção espermática, que aumente a taxa de recuperação sem prejudicar a qualidade dos espermatozoides é essencial.

A PIV de embriões aumentou significativamente ano após ano, com um total de mais de 500 mil embriões em 2014, totalizando 49% dos embriões produzidos (Blondin, 2016). O Brasil é o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo e mesmo diante da recessão econômica e instabilidade política, em 2015, foi responsável pela produção de mais de 350 mil embriões, somando 57,7% dos embriões PIV do mundo (Viana et al., 2017). A produção *in vitro* compreende três etapas, a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões. Para a FIV, é necessário realizar a seleção espermática a fim de recuperar espermatozoides de boa qualidade (Lee et al., 2009), além de remover componentes do diluidor, plasma seminal, debris celulares e agentes infectantes (Henkel e Schill, 2003). Há várias técnicas para a seleção espermática, entretanto, o método de gradiente descontínuo de Percoll é o mais utilizado atualmente em laboratórios de PIV de bovinos, devido a elevada recuperação celular e motilidade espermática que proporciona comparado aos demais (Cesari et al., 2006; Samardzija et al., 2006). A técnica do Percoll consiste na formação de um gradiente gradual, onde a densidade aumenta do sentido da camada superior para a inferior, sendo a amostra de sêmen depositada sobre essas camadas e centrifugada para obtenção de um *pellet* contendo os espermatozoides selecionados. Desde sua criação por Parrish et al. (1995), a técnica foi amplamente modificada principalmente com o aumento da utilização do sêmen sexado. Como as características espermáticas do sêmen sexado são próprias, os protocolos de seleção espermática utilizados para o sêmen convencional não são os mais indicados (Dell'aqua Jr. et al., 2006). Nesse sentido, modificações foram desenvolvidas, alterando o número e volume dos gradientes, aumentando a força e reduzindo o tempo de centrifugação (Machado et al., 2009; Folchini, et al., 2012; Guimarães et al., 2014). A otimização desses protocolos de seleção espermática para o sêmen sexado são interessantes não apenas pela redução do tempo de execução, mas principalmente por aumentar a taxa de recuperação e conseqüentemente o número de oócitos inseminados/palheta, reduzindo custos.

Protocolos utilizando volumes reduzidos de Percoll foram denominados de “mini-Percoll”, sendo inicialmente utilizados para reprodução assistida de humanos (Ord et al., 1990). Posteriormente, essa metodologia foi proposta para a separação de sêmen sexado em

bovinos, sendo empregado com sucesso em programas de PIV (Dell'aqua Jr. et al., 2006; Machado et al., 2009). Conforme Machado e colaboradores (2009) a redução do volume de Percoll não influencia os padrões de qualidade espermática, clivagem e produção de blastocistos, mesmo quando utilizadas diferentes forças e tempos de centrifugação para a seleção espermática do sêmen convencional. No entanto, apesar desta técnica ser empregada atualmente em vários laboratórios, não há estudos avaliando o volume mínimo de gradientes de Percoll capaz de aumentar a taxa de recuperação espermática sem influenciar nas características de qualidade dos espermatozoides tanto para o sêmen convencional quanto para o sexado. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da redução do volume de Percoll durante a seleção espermática de sêmen convencional e sexado na taxa de recuperação, características morfofuncionais dos espermatozoides e cinética do desenvolvimento de embriões bovinos PIV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História da tecnologia do sêmen sexado

A fim de elucidar o que determina o sexo da prole, diferentes teorias foram desenvolvidas ao longo da história. Parmênides (cerca de 515 a.C.) acreditava que o sexo do embrião era determinado pelo lado do útero em que o mesmo se desenvolvia, enquanto que Anaxágoras (cerca de 500-428 a.C.) sugeria que o lado do testículo do macho era o fator determinante (Mittwoch, 2005). Aristóteles (384-322 d.C.) criticou ambas as teorias citando evidências que, em animais, embriões de ambos os sexos podem ser encontrados no mesmo lado do útero, e que homens com apenas um testículo podem ter filhos de ambos os sexos (Mittwoch, 2005). Já no final do século 19, se acreditava que o sexo da prole era determinado por fatores ambientais como nutrição e temperatura, sendo que condições mais favoráveis originavam fêmeas ao invés de machos (Mittwoch, 2005). Apenas no século 20 com a descoberta dos cromossomos, foi possível definir que o sexo da prole é determinado pelos cromossomos sexuais (X e Y; Mittwoch, 2005). Considerando que espermatozoides com cromossomos X ou Y são produzidos em quantidades iguais (Graffelman et al., 1999; Garner e Seidel, 2008), pesquisas começaram a ser desenvolvidas para encontrar uma diferença mensurável entre eles, assim seria possível garantir a concepção com sexo predeterminado, surgindo a sexagem espermática (Grant e Chamley, 2007).

Ao longo dos anos, vários pesquisadores tentaram separar os espermatozoides X e Y utilizando diferentes técnicas, como hibridização *in situ* (Rens et al., 2001), imunosexagem (Blecher et al., 1999; Sang et al., 2011) e gradientes de densidade como o Percoll (Lima et al., 2011), entretanto a mais eficaz e que é utilizada comercialmente na atualidade é a sexagem por citometria de fluxo. Na década de 70, no Laboratório Nacional Lawrence Livermore, cientistas desenvolveram técnicas de citometria de fluxo que permitiram medir com precisão o conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático (Brito, 2017). Dessa forma, em 1983, pesquisadores demonstraram que a citometria de fluxo era capaz de determinar com precisão as diferenças de conteúdo de DNA entre espermatozoides X e Y de bovinos, ovinos, suínos e coelhos (Garner et al., 1983). A partir disso, foi possível mensurar

que o cromossomo X dos mamíferos contém entre 3 e 5% mais DNA que o cromossomo Y (Grant e Chamley, 2007), sendo que em bovinos essa diferença é de aproximadamente 3,7% (Garner et al., 1983). Além disso, sabe-se que há diferença no conteúdo de DNA entre raças bovinas, sendo no gado holandês essa diferença é de 4,98%, enquanto que nas raças Jersey, Angus, Hereford e Brahman são de 4,24; 4,05; 4,05 e 3,73%, respectivamente (Garner et al., 1983; Garner, 2001; 2006).

Após ser possível identificar a diferença na quantidade de DNA entre espermatozoides X e Y com a citometria de fluxo, Pinkel et al. (1982) relataram a separação desses espermatozoides em um roedor (*Microtus oregoni*), entretanto, o processo de preparação espermática danificou gravemente as células devido à remoção da cauda e das membranas antes da coloração com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) tornando as células inviáveis. Johnson e colaboradores (1987) modificaram o protocolo de coloração e passaram a utilizar o composto Bisbenzimidazol (Hoechst 33342), uma sonda fluorescente permeável que se liga ao DNA sem a necessidade de remover as membranas celulares. Assim, em 1989, houve o nascimento da primeira prole viva a partir de sêmen sexado em coelhos, utilizando espermatozoides corados com Hoechst 33342, sexados de acordo com o conteúdo de DNA por citometria de fluxo e com a inseminação realizada cirurgicamente no oviduto (Johnson et al., 1989). Essa técnica de sexagem espermática foi reconhecida como Beltsville e patenteada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) com o Dr. Lawrence Johnson como seu criador em 1991. Em meados da década de 90, após se obter dados satisfatórios em gado leiteiro com a utilização de sêmen sexado fresco, o USDA concedeu uma licença a *XY Incorporated* para aplicar comercialmente a tecnologia Beltsville em sêmen de mamíferos não humanos (Garner e Seidel, 2008). A partir de então, com o aprimoramento da velocidade da citometria de fluxo, acurácia de aproximadamente 90% (Johnson e Welch, 1999), desenvolvimento de métodos de criopreservação (Schenk et al., 1999) e taxas de prenhez aceitáveis obtidas com sêmen sexado congelado (Seidel et al., 1999) a aplicação comercial do sêmen sexado expandiu. Em 2004, a empresa Sexing Technologies (ST) obteve uma licença para realizar a sexagem espermática e três anos depois adquiriu a *XY Incorporated*. A ST reorganizou o enfoque comercial para permitir a produção de quantidades maiores de sêmen sexado com qualidade e custos razoáveis (Brito, 2017). Dessa forma, a patente criada em 1991, não expirou, entretanto dezenas de outras patentes com modificações no protocolo foram desenvolvidas ao redor do mundo, sendo que atualmente a maior parte da propriedade intelectual do sêmen sexado utilizado comercialmente é da ST (Seidel, 2014; Brito, 2017).

Com o passar dos anos, diferentes modificações foram desenvolvidas nos métodos de sexagem espermática por citometria de fluxo, como a velocidade de seleção de 350 mil células/h para 15-20 x 10⁶ espermatozoides/h (Hamano, 2007) e pressão de 50 para 40 psi (Suh et al., 2005). Nos últimos anos a ST lançou no mercado o SexedULTRA® e sexedULTRA4M®, tendo o último uma concentração de 4 x 10⁶ espermatozoides/dose. Estudos demonstraram que o SexedULTRA® apresentou resultados melhores que a tecnologia Bestville nas taxas de prenhez *in vivo* (Lenz et al., 2016) e produção de blastocistos *in vitro*, além de melhoria na qualidade espermática (Gonzalez-Marin *et al.*, 2016). Entretanto, quando comparado ao sêmen convencional, as taxas de prenhez em novilhas submetidas a protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, foram inferiores no grupo sexedULTRA® (Thomas *et al.*, 2017). Já estudos avaliando o sexedULTRA4M, observaram taxas de prenhez em novilhas similares as encontradas com sêmen convencional (15 x 10⁶ espermatozoides/dose; Lenz et al., 2016).

2.2 Produção de sêmen sexado por citometria de fluxo

A produção de sêmen sexado utilizado comercialmente se baseia na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides X e Y resultante da diferença de tamanho dos cromossomos X e Y (Garner et al., 1983). Para a produção de sêmen sexado bovino por citometria de fluxo, o DNA espermático é incubado por 45 minutos a 37 °C com uma sonda fluorescente específica para DNA, Hoechst 33342, que se liga à região adenina-timina dos ácidos nucléicos (Espinosa-Cervantes e Córdova-Izquierdo, 2013). Sinais de fluorescência são emitidos quando o Hoechst 33342 passa por um raio laser com ondas de 351 e 364 nm (Johnson et al., 1989; Seidel e Garner, 2002; Hamano, 2007). A intensidade da fluorescência emitida pelos espermatozoides corados com Hoechst 33342 é mensurada à medida que o fluxo de espermatozoides passa em frente de um tubo fotomultiplicador, sendo que a sua intensidade irá depender do número de moléculas fluorescentes unidas ao DNA, permitindo assim a diferenciação e separação de espermatozoides X e Y (Brito, 2017). Um software especializado para analisar a fluorescência emitida irá selecionar as populações espermáticas para capturá-las e um vibrador de cristal irá romper o fluxo e separar os espermatozoides em

gotículas individuais. Essas gotículas receberão uma carga elétrica positiva (espermatozoide com o cromossomo X) ou negativa (espermatozoide com o cromossomo Y), sendo que nenhuma carga será adicionada quando não houver espermatozoides na gotícula, houver mais de um ou os espermatozoides estiverem danificados. A partir disso, as gotículas passam por campos elétricos com um lado positivo e outro negativo, ocorre à atração por cargas opostas, separando assim as células em dois fluxos (X e Y). O terceiro fluxo de gotículas, com espermatozoides não classificados, mortos ou com dois espermatozoides é descartado (Seidel e Garner, 2002).

Após a separação, os espermatozoides são recolhidos em tubos contendo diluentes com tampões a fim de proteger as células durante o processo de classificação e resfriamento. Após a sexagem espermática, o processo de congelamento é similar ao do sêmen convencional. Os tubos são resfriados a 5°C, se adiciona o crioprotetor e realiza-se uma centrifugação para concentrar as células. Determina-se o número de células recuperadas e corrige o valor do diluente para obter a concentração desejada, que fica em torno de 8×10^6 espermatozoides/mL. Depois de um período de equilíbrio, o sêmen é envasado em palhetas e congelado (Seidel e Garner, 2002). O controle da qualidade pós-descongelamento implica na avaliação da motilidade e integridade de acrossoma depois de 3 horas de incubação a 35°C, análise de pureza, concentração e bacteriologia (Brito, 2017).

2.3 Características espermáticas do sêmen sexado

Sabe-se que a fertilidade do sêmen sexado é menor que a do sêmen convencional, possivelmente pelo resultado do processo da sexagem por citometria de fluxo, que envolve mais de 20 subprocessos (Brito, 2017). Dentre eles: a exposição do DNA a corantes, raio laser, separação dos espermatozoides em gotículas, altas pressões para passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade em um tubo, permanência por longos períodos em temperatura ambiente e centrifugação podem interferir na qualidade espermática e consequentemente reduzir a sua fertilidade (Gosálvez et al., 2011). Outro fator que pode influenciar a fertilidade do sêmen sexado é a menor concentração de espermatozoides por palheta (Liu et al., 2015). Conforme Frijters et al. (2009), o baixo número de células por dose

diminui em dois terços a fertilidade do sêmen enquanto o outro terço é resultante do processo de sexagem. Apesar de vários estudos avaliarem as características estruturais e funcionais dos espermatozoides sexados, ainda não foi identificada a real causa da menor fertilidade, a qual pode ser multifatorial (Carvalho et al., 2010).

Diferentes trabalhos comparam o sêmen sexado ao convencional e observaram que o sêmen sexado apresenta menor motilidade (Hollinshead et al., 2003; Blondin et al., 2009; Carvalho et al., 2009; 2010), motilidade progressiva (Rodríguez Villamil et al., 2012), vigor (Hollinshead et al., 2003), integridade da membrana plasmática e acrossomal (Rodríguez Villamil et al., 2012; Carvalho et al., 2014), potencial mitocondrial (Carvalho, 2013) e capacitação prematura (Hollinshead et al., 2003; Mocé et al., 2006; Carvalho et al., 2014). Ainda, Carvalho et al. (2009) avaliando a cinética espermática do sêmen sexado constataram que este apresenta maior velocidade curvilínea (VCL), batimento flagelar (BCF) e linearidade (LIN) que espermatozoides oriundos do sêmen convencional. Quanto à integridade do DNA, estudos relataram que o sêmen sexado possui menor (Boe-Hansen et al., 2005; Blondin et al., 2009; Gosálvez et al., 2011) ou igual (Carvalho et al., 2010) proporção de dano ao DNA quando comparado ao sêmen convencional. Isso pode ser resultante da seleção que ocorre durante o procedimento de sexagem espermática onde apenas espermatozoides viáveis são classificados (Boe-Hansen et al., 2005). Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica são maiores no sêmen sexado, logo que além da centrifugação utilizada para concentrar as células, durante a sexagem as defesas antioxidantes do plasma seminal são diluídas (Espinosa-Cervantes e Córdova-Izquierdo, 2013). Ainda, recente estudo realizado *in vitro* demonstrou que o processo de sexagem compromete a capacidade dos espermatozoides de permanecerem ligados às células do oviduto (Carvalho et al., 2018).

A maioria dos estudos desenvolvidos com embriões PIV afirma que a sexagem espermática reduz as taxas de fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário (Seidel, 2007; Palma et al., 2008; Bermejo-Alvarez et al., 2010; Rodríguez Villamil et al., 2012; Trigal et al., 2012; Rasmussen et al., 2013; Jo et al., 2014). Além disso, embriões produzidos com sêmen sexado apresentam diminuição na qualidade (Peippo et al., 2010) com prejuízo na cinética de desenvolvimento e blastocistos com alterações estruturais que incluem redução no número de organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso e danos em membranas nucleares (Palma et al., 2008). A expressão gênica também é diferente entre embriões oriundos de sêmen convencional e sexado (Morton et al., 2007). Entretanto, outros estudos afirmam que a produção de blastocistos não é influenciada pelo uso do sêmen sexado

(Zhang et al., 2003; Carvalho et al., 2010). Nesse sentido, vale ressaltar que os protocolos de PIV possuem diferenças entre laboratórios e modificações nos métodos de seleção espermática, contribuem com as diferenças na produção embrionária (Carvalho et al., 2010).

2.4 Produção *in vitro* de embriões bovinos com sêmen sexado

A PIV de embriões bovinos é uma técnica que requer um baixo número de espermatozoides para a produção de blastocistos (Rath et al., 2013). Nesse sentido, a PIV é capaz de maximizar o uso do sêmen sexado, logo que diferentemente da inseminação artificial, uma dose de sêmen é suficiente para fecundar vários oócitos de diferentes doadoras (Dell'aqua Jr. et al., 2006; Wheeler et al., 2006; Xu et al., 2009; Seidel, 2014). Embora o primeiro bezerro oriundo da PIV produzido com sêmen sexado tenha nascido a mais de 20 anos atrás (Cran et al., 1993) e as taxas de produção embrionária terem aumentado de menos de 20% nos final dos anos 1990 para mais de 30% utilizando diferentes meios e sistemas de cultivo, esses resultados ainda são inferiores a utilização do sêmen convencional (Jo et al., 2014). Diferentes fatores podem contribuir para esses resultados, como variação entre touros, dose inseminante, concentração de heparina e método de seleção espermática.

O efeito do touro sobre a taxa de blastocistos é reconhecida tanto para o sêmen convencional (Rehman et al., 1994; Ward et al., 2001) quanto para o sêmen sexado (Blondin et al., 2009; Xu et al., 2009; Barceló-Fimbres et al., 2011; Zhao et al., 2014; Liu et al., 2015). Estudo desenvolvido por Barceló-Fimbres et al. (2011) constatou que, cerca de um terço dos touros tiveram resultados insatisfatórios para a FIV com sêmen sexado. Fatores que podem estar relacionados com esse “efeito touro” são a concentração de heparina e a dose inseminante utilizada na PIV. A heparina possui por finalidade capacitar os espermatozoides *in vitro*. Embora Blondin e colaboradores (2009) afirmem que a concentração de heparina não influencia a produção de embriões, há relatos que variações individuais são necessárias para capacitar os espermatozoides bovinos (Lu e Seidel, 2004; Barceló-Fimbres et al., 2011). Palma e colaboradores (2008) observaram que alguns touros produziram blastocistos com somente 2 µg/mL de heparina no meio, enquanto outros necessitavam de concentrações mais

elevadas (5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para produzirem altas taxas de blastocistos, indicando que um ajuste nas concentrações de heparina para cada touro poderia aumentar a produção de embriões. Em um estudo recente, An et al. (2017) demonstraram que apesar do sêmen sexado de diferentes touros dependerem de concentrações diferentes de heparina, de forma geral, a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pode ser utilizada na FIV com sêmen sexado. Entretanto a concentração de heparina mais utilizada em laboratórios comerciais é de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio. Portanto, o “efeito touro” observado nos programas de PIV pode ser resultante das diferentes concentrações de heparina necessárias para capacitar os espermatozoides durante a fecundação (Lu e Seidel, 2004; Barceló-Fimbres et al., 2011).

A concentração de espermatozoides necessária para fecundar os oócitos também deve ser considerada para a PIV com sêmen sexado. Lu e Seidel (2004) avaliando diferentes concentrações (0,5; 1,5 e 4,5 x 10⁶ espermatozoides/mL) relataram que aumentando a dose inseminante, a taxa de clivagem aumenta, apesar da produção de blastocistos não ser influenciada. Já estudo realizado por Barceló-Fimbres et al. (2011) usando a concentração de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL obteve os melhores resultados para a produção de embriões com sêmen sexado. Nesse sentido, Inaba et al. (2016) compararam diferentes touros e diferentes concentrações e observaram que para cada touro há uma concentração ideal que varia de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides/mL, sendo que quando as concentrações ideais para cada touro foram utilizadas, não houve diferença na taxa de blastocistos para o sêmen convencional, enquanto que para o sêmen sexado esta diferença foi apenas para um touro.

A PIV compreende três etapas, a MIV, a FIV e o CIV. Durante o passo da FIV, é necessária a realização da seleção espermática. Conforme Samardzija et al. (2006), a seleção espermática, entre outros fatores, tem um importante papel na qualidade dos embriões produzidos.

2.4.1 Seleção espermática para produção *in vitro* de embriões

A técnica de seleção espermática ideal deverá ser rápida, fácil e econômica, isolar o maior número possível de espermatozoides móveis, não causar danos nas células recuperadas,

eliminar espermatozoides mortos e outras células, bem como ROS e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculado (Henkel e Schill, 2003). Entre as técnicas de seleção estão o *swim-up* (Berger e Parker, 1989), gradientes descontínuos de Percoll (Berger e Horton, 1988; Mattioli et al., 1989; Jeong e Yang, 2001) e outros coloides (Morrell et al., 2009), filtração em coluna de gel de Sephadex (Bussalleu et al., 2009) ou filtração por coluna de vidro (Berger e Horton, 1988). Entre eles, o gradiente descontínuo de Percoll é o método mais utilizado para a PIV (Morrell, 2006; Samardzija et al., 2006). Embora se saiba que o *swim up* proporcione a seleção de espermatozoides com melhor qualidade, a taxa de recuperação é inferior à obtida pela seleção por gradientes de Percoll (Parrish et al., 1995; Cesari et al., 2006; Morrell, 2006). Além disso, a seleção por gradientes de Percoll possibilita a seleção de espermatozoides com elevada motilidade e com qualidade morfológica superior (Parrish et al., 1995; Prakash et al., 1998; Cesari et al. 2006). Em um estudo recente, Arias et al. (2017) compararam os três métodos mais frequentes de seleção espermática em laboratórios de reprodução animal (Percoll, *swim-up* e Bovisperm) e relatam que a motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), batimento flagelar (BCF) e produção de ROS são superiores quando utilizado o Percoll. Entretanto, a integridade das membranas plasmática e acrossomal foram similares entre Bovisperm e Percoll. Além disso, estudos em bovinos e ovinos demonstraram que a passagem pelo Percoll foi eficaz para a separação de maior parte de espermatozoides móveis, com membrana plasmática e acrossomal integras (Zúccari et al., 2008; Noguchi et al., 2015).

O Percoll é composto por partículas de sílica com 15 a 30 nm de diâmetro, recobertas com polivinilpirrolidona (PVP; Samardzija et al., 2006), com peso molecular de 6×10^6 e densidade de 1,13 g/mL (Pertoft, 2000). A centrifugação em gradientes de Percoll separa os espermatozoides de acordo com sua maturidade e integridade de diluentes, células e bactérias, baseado na diferença de densidade celular. Sabe-se que espermatozoides maturados tem uma densidade maior do que os imóveis ou imaturos (Oshio, 1988). Além disso, os espermatozoides possuem densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, podendo assim ser separadas de outros componentes do ejaculado. Em bovinos, a separação por gradientes de densidade tem aumentado a qualidade espermática, principalmente nos casos de alta viscosidade, pobre qualidade ou de sêmen criopreservado (Henkel, 2012).

O método de gradiente descontínuo de Percoll seleciona os espermatozoides através da centrifugação (Parrish et al., 1995) e consiste na formação de um gradiente com diferentes densidades, onde esta aumenta no sentido da camada superior para a inferior; permitindo a seleção e passagem dos espermatozoides de acordo com a sua densidade, estágio de maturação e integridade (Pertoft, 2000). A amostra de sêmen é depositada sobre os gradientes, sendo realizada a centrifugação para obtenção de um *pellet* contendo os espermatozoides selecionados. Assim, após a centrifugação os leucócitos, debris celulares e espermatozoides com lesão de DNA são concentrados na interface entre o plasma seminal e a camada superior, espermatozoides com morfologia anormal se acumulam na interface entre a camada superior e a camada inferior, enquanto os espermatozoides móveis e maturados em um *pellet* no fundo do tubo (Pertoft, 2000; Sakkas et al., 2015). Uma segunda centrifugação utilizando um meio específico é realizada a fim de remover o Percoll da amostra que será incubada com os oócitos. Para bovinos, inicialmente esta técnica preconizava a utilização de dois gradientes (90 e 45%) com um volume médio de 2 mL por gradiente. Entretanto, ao longo dos anos o método foi amplamente modificado no que se refere ao volume e número de gradientes, assim como tempo e força de centrifugação.

Pesquisadores a fim de aumentar a recuperação espermática e as taxas de fecundação em pacientes com oligoastenozoospermia severa ($< 5 \times 10^6$ espermatozoides/mL) desenvolveram uma metodologia denominada de “mini-Percoll” na qual o volume de Percoll era reduzido de 1 mL para 300 μ L por gradiente (95, 70 e 50%), utilizando uma força de centrifugação de $3000 \times g$ por 30-45 minutos (Ord et al., 1990). Estudos posteriores comparando as técnicas de Percoll e *swim up*, observaram que a taxa de recuperação foi superior com Percoll e mini-percoll, entretanto, os padrões de qualidade espermática foram superiores quando *swim up* foi utilizado (Ng et al., 1992). Apesar disso, os autores sugeriram que a maior taxa de recuperação, consegue sobrepor os problemas com qualidade, considerando os métodos com Percoll mais promissores. Resultados similares foram encontrados comparando Percoll, mini-Percoll e Sephadex (Bollendorf et al., 1994), onde a taxa de recuperação foi superior a 55% com o uso de Percoll, entretanto os parâmetros de qualidade espermática foram prejudicados. Através desses resultados é possível inferir que o Percoll foi eficaz na recuperação espermática, entretanto os padrões de qualidade podem ter sido influenciados pela contaminação por endotoxinas presentes nele, sendo posteriormente sua utilização proibida para técnicas de reprodução assistida em humanos. No entanto, em

laboratórios comerciais de PIV de bovinos, o gradiente descontínuo de Percoll ainda é o método mais utilizado para seleção espermática.

Se em humanos o aperfeiçoamento de protocolos de seleção espermática foi devido a pacientes com baixa concentração espermática, em bovinos a crescente utilização de sêmen sexado fez com que modificações nas técnicas de seleção com Percoll fossem realizadas, principalmente quanto ao volume e ao número de gradientes, força e tempo de centrifugação (Machado et al., 2009; Folchini, et al., 2012; Guimarães et al., 2014). As características espermáticas do sêmen sexado são próprias, assim os protocolos de seleção espermática utilizados para o sêmen convencional não são os mais indicados (Dell'aqua Jr. et al., 2006). Como a concentração espermática do sêmen sexado é inferior a do sêmen convencional (2 vs 20×10^6 espermatozoides/dose), bem como os padrões de motilidade, ocorre dificuldade na sedimentação dos espermatozoides após a seleção por gradientes de Percoll, assim a taxa de recuperação é inferior e conseqüentemente ocorre redução no número de oócitos que podem ser fecundados (Dell'aqua Jr. et al., 2006). Nesse sentido, protocolos foram desenvolvidos, diminuindo o volume dos gradientes de Percoll, aumentando a força e reduzindo o tempo de centrifugação.

Trabalhos realizados na década de 90 que preconizavam a utilização de 2 mL por gradiente de Percoll e uma centrifugação a $400 \times g$, por um tempo de até 30 minutos foram substituídos, e assim como para humanos, denominados de “mini-Percoll”. Para a FIV de bovinos, Folchini et al. (2012) demonstraram que a substituição de dois (90 e 45%) para três gradientes de densidade (90, 60 e 30%) diminui a produção de ROS, sem interferir nas taxas de recuperação e qualidade espermática. Associando a redução no volume, o aumento do número de gradientes e a necessidade de aumentar o número de células recuperadas, a força de centrifugação de $400-700 \times g$ foi aumentada para até $9.000 \times g$ (Dell'aqua Jr. et al., 2006; Folchini et al., 2012). Com o aumento da força, protocolos cujo tempo de centrifugação variavam de 20-30 minutos, tiveram seu tempo reduzido a 3-5 minutos, tornando o procedimento extremamente rápido. Machado e colaboradores (2009) relataram que a diminuição do volume de Percoll para seleção de sêmen convencional de 2 mL para 400 μ L usando baixa ($700 \times g$) ou alta ($5000 \times g$) força de centrifugação por 20 ou 5 minutos, respectivamente, não alterou a taxa de recuperação, características de qualidade espermática e produção de embriões. Entretanto, considerando que altas forças de centrifugação causam o aumento das taxas de recuperação (Waite et al., 2008), um longo tempo de centrifugação,

pode ter igualado essas taxas entre os tratamentos. Guimarães et al. (2014) comparando diferentes forças de centrifugação, relataram que a utilização de 300 μ L por gradiente (90,60 e 30%) e forças que variaram de 2.200 a 9.000 \times g por 5 minutos, não encontraram diferença nas taxas de recuperação espermática após a seleção. Outra modificação que vem sendo desenvolvida a fim de aperfeiçoar os protocolos de seleção espermática é a centrifugação com um meio de amortecimento, como o iodixanol. Estudo demonstrou que a utilização de iodixanol para a seleção espermática por gradiente descontínuo de Percoll para sêmen bovino, diminuiu a produção de ROS e aumentou as taxas de fecundação, clivagem e número de blastocistos produzidos (Pavin, 2016). Portanto, ainda é necessária a otimização dos protocolos de seleção espermática utilizando gradientes de Percoll para o sêmen sexado, a fim de aumentar a taxa de recuperação, sem alterar a qualidade espermática, permitindo um maior aproveitamento do sêmen e redução dos custos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo eficiente para separação espermática por gradientes descontínuos de Percoll para sêmen sexado bovino.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a redução no volume de Percoll durante a seleção espermática influencia:
 - A taxa de recuperação espermática;
 - As características morfofuncionais dos espermatozoides;
 - A produção de ROS;
 - As taxas de fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial.
- Avaliar o volume de Percoll que proporcione melhor taxa de recuperação espermática, sem afetar as características morfofuncionais, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

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

ARTIGO CIENTÍFICO**REDUCTION IN PERCOLL VOLUME INCREASES RECOVERY RATE OF SEX-SORTED SEMEN OF BULLS WITHOUT AFFECTING SPERM QUALITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT**

doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.002

Daniele Missio^{a*}; Natália Picolli Folchini^a; Fabio Gallas Leivas^a; Cecília Isabel Inês Urquiza Machado Pavin^a; Hirya Fernandes Pinto^a; Francielli Weber Santos Cibirin^a; Daniela dos Santos Brum^a

^a Federal University of Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab. Biotechnology of Reproduction, 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

* Corresponding author: Rod. BR 472, Km 587, Cx. Postal 118 - 97.500-970, Tel/fax.: +555534134321. E-mail: daniele.missio@yahoo.com.br (Daniele Missio).

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of Percoll volume on recovery rate, sperm quality, and embryo development kinetics in *in vitro* production of cattle embryos. Straws of conventional and sex-sorted semen were allocated to three different volumes of Percoll: 300 μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%), Control; 100 μ L of each Percoll gradient, P100; and 200 μ L of each Percoll gradient, P200. Sperm quality, fertilization rate, and embryo morpho-kinetic development using time lapse cinematography up to 48 h post-insemination were evaluated. For conventionally processed semen, sperm motility, vigor, and recovery rate were greater in the P100 and P200 treatment groups compared to the Control ($P < 0.05$), whereas reactive oxygen species (ROS) concentrations, lipid peroxidation, and superoxide dismutase enzyme activity were not influenced by treatments. For sex-sorted semen, treatment with P100 increased sperm curvilinear velocity, average path velocity, and amplitude of lateral head displacement ($P < 0.05$). Recovery rate was greater in the P100 group than Control and P200 groups ($P < 0.05$), formation of ROS was less in the P100 than Control and P200 groups, and superoxide dismutase enzyme activity was less in the P100 than Control group. Fertilization and cleavage rates, time of first cleavage, and cell number were similar between the P100 and Control groups ($P > 0.05$). The inclusion of Percoll volumes of 100 μ L resulted in an increased sperm recovery rate without damage to sperm quality or affecting early embryonic development.

Keywords: Sperm selection; Sexed semen; Sperm kinetics; Cattle; Percoll gradient

1. Introduction

Sex-sorted semen has been commercialized in Brazil since 2006 and its use has increased markedly due, in part, to its wide use in *in vitro* embryo production, which is considered a valuable alternative to maximize profitability of cattle enterprises via production of offspring of the desired gender (Xu et al., 2009; Trigal et al., 2012; Carvalho et al., 2014). Sex-sorted sperm have less efficacy *in vitro* as well as *in vivo* owing to the detrimental effects of the sorting procedure on sperm cells (Garner and Seidel, 2008). Alterations observed in sex-sorted sperm consist of a greater incidence of cell damage (Seidel and Garner, 2002); lesser percentage of progressive motility (Rodríguez-Villamil et al., 2012); enhanced membrane and acrosomal damage (Hollinshead et al., 2003; Carvalho et al., 2010); acceleration of the acrosome reaction (Mocé et al., 2006); premature capacitation (Hollinshead et al., 2003); reduction in fertilization, cleavage, and development rates (Lu et al., 1999; Wilson et al., 2006; Seidel, 2007; Palma et al., 2008; Rodríguez-Villamil et al., 2012; Trigal et al., 2012); and production of embryos with slower developmental kinetics and blastocysts with ultrastructural alterations (Palma et al., 2008). Collectively, these factors are associated with a reduced number of sperm per straw and might explain the negative impact on fertility of programs employing sex-sorted semen (Trigal et al., 2012). To increase the practical use of sex-sorted semen technology for IVP, it is essential develop an effective method for sperm selection, which improves recovery rate and preserves sperm quality.

The centrifugation through colloids has been used to select normal sperm for assisted reproduction in several species (Abraham et al., 2016). Percoll is the most widely used density gradient medium for sperm selection in *in vitro* production of cattle embryos (Morrell, 2006; Samardzija et al., 2006) because with use of Percoll there is selection of highly motile sperm with superior morphological quality (Parrish et al., 1995; Prakash et al., 1998; Cesari et

al. 2006). With the increasing utilization of sex-sorted sperm, changes in Percoll protocols have been proposed with the aim of improving sperm recovery, optimizing the use of semen (Dellaqua-Junior et al., 2006; Ferré et al., 2017), and reducing economic costs. Among the proposed protocol modifications, Percoll volume, time, and force of centrifugation have been the most promising (Folchini et al., 2012; Guimarães et al., 2014), all influencing on the isopycnic point of sperm. In a study by Machado et al. (2009) using conventionally processed semen, it was observed that a reduction in Percoll volume did not influence the quality or recovery of sperm. Studies evaluating the influence of Percoll volume reduction on the selection of sex-sorted semen, however, have not been reported. Thus, the aims of the present study were to investigate the effects of reduced Percoll volume on recovery rates, sperm quality characteristics, and embryo development kinetics in *in vitro* production of cattle embryos.

2. Materials and methods

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

2.1. Experimental design

For the present study, three experiments were designed to evaluate the effects of reduced Percoll volume on recovery rate, sperm quality, and early development of cattle embryos. In Experiment I, straws of conventionally processed semen from two bulls with proven field fertility were used for determining the least Percoll volume resulting in recovery the greatest sperm cell number with minimal to no effect on sperm quality. In Experiments II and III, straws of frozen sex-sorted semen from two bulls with proven fertility were used to assess the

effect of reduced Percoll volume on sperm quality and early embryo development. Each straw (0.25 mL) was thawed at 35 °C for 20 s and divided into equal aliquots to be processed for sperm selection under different Percoll volumes. In Experiments I and II (five replicates each), conventional and sex-sorted semen, respectively, were pooled after thawing and divided to be processed by Percoll gradients of three different volumes: 300 µL of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%), Control; 100 µL of each Percoll gradient, P100; and 200 µL of each Percoll gradient, P200. After centrifugation, recovered sperm cells were utilized to determine the effects of Percoll volume on recovery rate, sperm characteristics, sperm membrane integrity, reactive oxygen species (ROS) production, antioxidant activity, and lipid peroxidation. In Experiment III (eight replicates), the use of the Percoll gradient that resulted in recovery of more sperm cells without affecting cell viability in Experiments I and II was selected to separate sex-sorted semen samples and evaluate the effects on fertilization rate and embryo development kinetics up to 48 h post-insemination (hpi). Sperm cells were then divided into two groups: Control and P100.

2.2. Sperm selection procedure

An isotonic Percoll solution was used to prepare diluted solutions of 90%, 60%, and 30% with modified Fert-TALP medium (Parrish et al., 1986). The Percoll density gradient was created by the layering of 100 (P100), 200 (P200), or 300 µL (Control) of each Percoll gradient in a 1.5-mL conical tube starting with the 90% Percoll solution at the bottom of the tube. On top of the Percoll gradient, 150 µL of thawed semen was layered and the tubes were centrifuged for 5 min at 2.200×g (Guimarães et al., 2014). The resultant pellet was subsequently re-suspended in 300 µL of sp-TALP and centrifuged again for 1 min at 2.200×g. After centrifugation, samples were used for sperm analysis (Experiments I and II) or *in vitro* fertilization (IVF; Experiment III).

2.3. Sperm quality parameters assessment

2.3.1. Assessment of motility, vigor, and sperm concentration

The percentage of motile sperm and sperm vigor were determined subjectively in a drop of semen placed on a pre-warmed glass slide covered with a cover slip, and examined using a bright-field microscope (CX-31; Olympus, Tokyo, Japan) at 100× magnification. All evaluations were performed by the same person. Sperm concentration was determined with a hemocytometer at a 1:20 dilution and values of sperm cells/mL were recorded. Sperm cell recovery rates were calculated based on the formula described by Machado et al. (2009), where recovered sperm (%) = $(\text{Final concentration} \times \text{final volume}) / (\text{Initial concentration} \times \text{initial volume}) \times 100$.

2.3.2. Assessment of sperm cells kinetics

The kinetics of sperm cells was analyzed using a Computer Assisted Semen Analysis system fitted with Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The following variables were analyzed: percentage of total motile sperm (%); percentage of progressively motile sperm (PM, %); average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$; the average velocity of the smoothed cell path); curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$; the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell); straight line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$; average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track); linearity (LIN, %; the average value of the ratio VSL/VCL); straightness index (STR, %; average value of the ratio VSL/VAP); amplitude of lateral head displacement (ALH, μm ; mean width of the head oscillation as the sperm cells swim); beat cross frequency (BCF, Hz; frequency of the sperm head crossing the average path in either direction); and wobble (WOB = $\text{VAP/VCL} \times 100$, %; a measure of the oscillation of the actual trajectory about its spatial average path).

2.3.4. Assessment of plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was evaluated following the technique described by Harrison and Vickers (1990), using a mixture of the probes propidium iodide (0.5 mg/mL) and carboxy fluorescein diacetate (0.5 mg/mL). After incubation for 8 min at 37 °C, sperm were counted using an epifluorescence microscope (IX-51; Olympus, Tokyo, Japan) at 400× magnification. For each slide, a total of 200 sperm cells were counted and classified as having either an intact or damaged plasma membrane. Those cells stained green with carboxy fluorescein diacetate were considered to have an intact membrane, whereas those that stained red with propidium iodide were characterized to have a damaged membrane.

2.3.5. Assessment of ROS production

The ROS concentrations were measured using a spectrofluorimetric method (Loetchutinat et al., 2005) where sperm cells were incubated in Tris-HCl in the presence of 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at 37 °C in the dark. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. The DCHF-DA is a stable, cell-permeable, non-fluorescent probe. Upon oxidation, it becomes de-esterified intracellularly and converts to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent DCF was used to detect and measure intracellular ROS concentrations. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) using a Shimadzu spectrofluorometer (model RF5301PC; Japan). The ROS concentrations were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

2.3.6. Assessment of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was performed by the formation of thiobarbituric acid reactive substances during an acid-heating reaction as previously described by Ohkawa et al. (1979). An aliquot of sperm cells was incubated at 95 °C for 2 h. The absorbance was read at 532 nm

(Hidex Plate Chameleon V Multitechnology Platereader, model 425–156). The data were expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein.

2.3.7. Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome. The color reaction can be monitored at 480 nm. One enzymatic unit (1 IU) is defined as the amount of enzyme necessary to inhibit the epinephrine auto-oxidation rate by 50% at 26 °C.

2.4. *In vitro* embryo production (IVP)

Ovaries from cows were collected immediately after slaughter and transported to the laboratory in saline solution (0.9% NaCl) supplemented with antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) at 30 °C. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 2 to 8 mm diameter follicles using an 18-gauge needle attached to a vacuum pump. Only COCs with homogenous cytoplasm and at least three layers of cumulus cells were included (Stojkovic et al., 2001). Groups of 20 COCs were *in vitro* matured within 90 µL drops of modified TCM-199 medium with 10% estrous mare serum. This medium was supplemented with 5 µg/mL of porcine follicle-stimulating hormone, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 50 µg/mL of porcine pituitary luteinizing hormone, LH-P (Lutropin-V®; Bioniche Animal Health), 100 µg/mL of human epidermal growth factor (hEGF), and 22 µg/mL of pyruvate and gentamicin sulfate. For *in vitro* maturation, the COCs were cultured for 24 h at 39 °C in a gaseous atmosphere with 5% CO₂ in air and saturated humidity. After maturation, COCs were transferred to a 80 µL drop containing modified Fert-TALP medium (Parrish et al., 1995), 22 µg/mL pyruvate, 6 mg/mL bovine serum albumin, 10 µg/mL heparin, 20 µM/mL penicillamine, 10 µM/mL hypotaurine,

and 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ epinephrine, prepared in dishes under mineral oil. After separation of frozen semen samples of different Percoll volumes, as previously described, sperm cells were counted in a hemocytometer and added into the fertilization drop (final concentration, 1×10^6 sperm cells/mL). The spermatozoa and oocyte co-culture was performed at 39 °C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO_2 in air (the day of IVF was defined as day 0). At 18 hpi, the potential zygotes were divided into two groups for evaluation of either fertilization or kinetics of embryonic development.

For evaluation of fertilization, the *cumulus oophorus* cells were removed by successive pipetting and the potential zygotes were stained for 10 min (1% Hoechst 33342 in phosphate-buffered saline [PBS]), washed with PBS containing 1 mg/mL polyvinylpyrrolidone, mounted on glass slides, and examined using an epifluorescence microscope (IX-51; Olympus, Tokyo, Japan) at 400 \times magnification to assess for sperm penetration and fertilization. Oocytes that had two pro nuclei or that had extrusion of the second polar body and one sperm in decondensation were considered normal fertilized oocytes. The total fertilization rate was considered when the oocyte had two or more pro nuclei.

To evaluate the kinetics of embryonic development, the *cumulus oophorus* cells were removed by successive pipetting of potential zygotes. Synthetic oviduct fluid with amino acids, citrate, and myo-inositol (Holm et al., 1999) was used as the culture medium. The potential embryos were transferred individual to the 9-wells of a well-of-the-well culture dish (Primo Vision culture dish, Cryo-Innovation Technologies; Budapest, Hungary) and cultured in groups under mineral oil at 39 °C with saturated humidity and a gaseous atmosphere of 5% CO_2 in air for up to 48 hpi. Culture dishes were incubated on the stage of a compact digital inverted microscope designed for use inside an incubator, allowing for automated time-lapse analysis (Primo Vision time-lapse embryo monitoring system; Cryo-Innovation Technologies,

Budapest, Hungary). The image capture frequency was set to 5 min. The embryos were individually evaluated on day 2 for cleavage, time of first cleavage, and number of cells.

2.5. Statistical analysis

The normality of the tests was analyzed with Shapiro-Wilk and D'Agostino-Person tests. The effects of Percoll volume on sperm characteristics of motility, vigor, sperm kinetics, membrane integrity, recovery rate, production of ROS, lipid peroxidation, and SOD activity were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test. Fertilization and cleavage rates were analyzed by the Chi-square test. Mean of the moment of the first cleavage and numbers of cells at 48 hpi were analyzed by using the Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

In Experiment I, after assessing the effects of different Percoll volumes (100, 200, or 300 μL) on sperm selection of conventional semen, motility, vigor, and recovery rates were greater with the P100 and P200 treatments compared with the Control. A greater proportion of intact plasma membrane was observed after Percoll centrifugation with the P200 treatment than with the Control and P100 treatments (Table 1). The ROS concentrations (44.5 ± 2.6 UF), lipid peroxidation (7.49 ± 0.95 nmol MDA/mg protein), and SOD enzyme activity (46.1 ± 2.43 IU) were not influenced by treatments ($P > 0.05$).

In Experiment II, after assessing the effects of different Percoll volumes of sex-sorted semen, the percentage of motility, PM, VSL, LIN, STR, WOB, and BCF were similar ($P > 0.05$) for all treatments. The VCL, VAP, and ALH of sperm after selection using the P100 treatment were greater than with the Control and P200 treatments (Table 2). The sperm recovery rate was greater with the P100 treatment than the Control and P200 treatments. The

use of 100 μ L Percoll decreased the rate of sperm having an intact plasma membrane after selection. The formation of ROS was less with the P100 treatment than with the Control and P200 treatments. Accordingly, SOD activity was less with the P100 than Control treatment. Lipid peroxidation, however, did not differ among treatments (Table 3).

In Experiment III, fertilization rates after use of the semen that had been processed using the Percoll gradients were similar ($P > 0.05$) for all treatments (Table 4). There were no differences in cleavage rate, average time of first cleavage, and cell number after 48 hpi for the two treatment groups ($P > 0.05$).

4. Discussion

Desirable separation techniques preceding an IVF procedure should result improved sperm quality characteristics and removal of seminal plasma, dead sperm, and other cells (Henkel and Schill, 2003). Many sperm separation techniques have been developed with this aim. Among these techniques, single layer centrifugation (SLC) using the glycidoxypropyltrimethoxysilane-coated silica preparation is commercially available for several species (Thys et al., 2009) and was developed to replace the Percoll gradient, which is prohibited for use when applying assisted reproduction techniques in humans, due to the presence of endoxins in some batches (Chen and Bongso, 1999). The advantage of SLC is that it is easier to use, requiring fewer steps in the preparation, and can be used to process large (Morrell et al., 2009) or small volumes of semen (Abraham et al., 2016). There, however, are no studies evaluating the SLC for the sperm selection of sex-sorted bull semen, and the Percoll gradient is still routinely applied for bull sperm preparation IVF laboratories owing to the greater motility and number of insemination doses resulting from the processing (Cesari et al., 2006). Although the Percoll protocol has undergone slight changes over the years, with the recent widespread use of sex-sorted sperm in commercial IVF, additional

modifications have been proposed (Machado et al., 2009; Rasmussen et al., 2013; Ferré et al., 2017). Considering that sex-sorted semen has a relatively lesser sperm concentration in commercial doses (2×10^6 sperm cells/straw), relatively lesser post-thaw motility (Barceló-Fimbres et al., 2011), and a greater economic cost than conventional semen, alternative methods with great efficiency are required to provide for greater sperm recovery rates. The present study compared three volumes of Percoll used for sperm separation to determine the effects on recovery rate, sperm quality end points, and kinetics of embryonic development. Results of the present study indicate, for the first time, that the use of 100 μ L of Percoll per layer of the gradient during sperm selection for IVP increases sperm recovery, without interfering with fertilization and embryonic development up to 48 hpi.

Sperm recovery rate of sex-sorted semen is important to IVP because it optimizes its use (Dellaqua-Junior et al., 2006) by allowing an increase in the number of oocytes that can be fertilized/straw and reduces costs. In the present study, the recovery rate after sperm selection was greater in the P100 treatment group for conventional and sex-sorted semen, thus demonstrating that sperm recovery and sperm quality can be influenced by the use of a relatively lesser volume of Percoll. These results are not consistent with those obtained by Machado et al. (2009) who reported that decreasing the Percoll volume to 400 μ L using a relatively lesser (700 \times g) and greater (5000 \times g) centrifugation force for 20 and 5 min, respectively, did not change the recovery rate. Considering that greater centrifugation forces promote a greater sperm recovery (Waite et al., 2008), the use of a longer time of centrifugation may have enhanced the recovery rate using the treatments. In the present study, a centrifugation force of 2200 \times g was used for 5 min, which when used with a volume of 300 μ L does not detrimentally affect the recovery rate (Guimarães et al., 2014), thus suggesting that the sperm recovery was influenced by the Percoll volume.

In the present study, the sperm kinetics evaluated by the SCA system for analysis of total motility, PM, VSL, LIN, STR, WOB, and BCF were similar between the Control and other treatment groups. Use of the P100 treatment, however, improved the VCL, VAP, and ALH compared with the Control and P200 treatments. It has been previously reported that ALH, BCF, LIN, and speed variables are highly correlated with the fertility of bulls (Farrell et al., 1998; Nagy et al., 2015). In other previous studies, the ALH was related to the sperm capacity to penetrate the zona pellucida and is one of the variables that have an effect on fertilization (Verstegen et al., 2002; Bliss et al., 2012; Papa, 2015). Furthermore, VCL, VSL, LIN, and ALH have been correlated with the hyperactivity of sperm in several species (Mortimer and Maxwell, 1999; Cancel et al., 2000; Mortimer, 2000; Schmidt and Kamp, 2004). Although not statistically significant, BCF was also numerically greater for the P100 group when compared with the other groups. Furthermore, sperm plasma membrane damage was also greater for the P100 group. Based on the results obtained in the present study, sperm cell characteristics of sex-sorted semen after selection with low Percoll volume (P100) have characteristics that indicative of hyperactivity and acrosome-responsive sperm. The hyperactivation is a motility pattern observed in sperm undergoing capacitation, samples having this motility pattern may remain viable for a shorter time and, therefore, have a lesser in vivo fertilization capacity (Lavara et al., 2005). In the present study, the hyperactivation and acrosome-responsive sperm of the sex-sorted semen after selection using 100 μ L of Percoll, was correlated with lesser fertilization and cleavage rates, as well as with the delay of the first cleavage and number of cells of the developing embryo, although there was no statistical difference among the groups.

Generally, mammalian sperm membranes are rich in polyunsaturated fatty acids and are sensitive to oxygen-induced damage resulting from lipid peroxidation (Zalata et al., 2004). Several studies have indicated that sperm need small amounts of ROS for capacitation,

hyperactivation, motility, acrosome reaction, and fertilization (Lamirande and Gagnon, 1993; Olugbenga et al., 2011). An imbalance between ROS generation and antioxidant capacity, however, induces oxidative stress, which is associated with male infertility. The preparation of frozen semen for IVF includes thawing, washing, and centrifugation processes that markedly increase ROS concentrations in sperm suspensions (Alvarez et al., 1996; Agarwal et al., 2006, 2008). In the present study, the use of 100 μ L Percoll for sex-sorted semen was associated with ROS production and SOD activity compared to the values for these variables in the Control group, so it is suggested that the lesser concentrations of ROS were beneficial for sperm, because of the lesser activity of the SOD enzyme indicating a lesser ROS production and oxidative stress. In addition, there was no difference in lipid peroxidation among treatments. Possible interventions, therefore, that reduce oxidative stress in semen could be important for enhancing embryo quality. Silva et al. (2007) reported that the effect of oxidative stress on sperm is most apparent after the first cleavage of the zygote. In the present experiment, there was no difference in fertilization and kinetics of embryo development, suggesting that the treatments did not cause oxidative stress in sperm. Results when using the *in vitro* sperm penetration and fertilization tests are reliable for semen assays and use of the results may allow for improving the *in vitro* assessment of sperm fertilization capacity (Gadea et al., 1998). Besides fertilization rate, another technique to evaluate sperm capacity and oocyte competence is monitoring of the kinetics of embryonic development. In the present study, the lesser Percoll volume treatment did not influence the fertilization and cleavage rate. A study performed by Machado et al. (2009) provided evidence of the value of similar sperm quality end points as those in the present study, rates of cleavage, and blastocyst formation using different Percoll volumes and centrifugation forces for sperm selection. The timing of specific developmental aspects during the earliest stages of tissue differentiation may be associated with subsequent embryonic viability (Edwards, 2003). Reports from several studies

(Loneragan et al., 1999; Barreta et al., 2012) have indicated embryonic cleavage is directly related to the capacity for future development, suggesting that the earlier the division starts, the greater the probability of development to the blastocyst stage. In the present study, although the time of the first cleavage was delayed and the number of cells reduced numerically in the P100 group, this was not confirmed statistically, suggesting that the use of 100 μ L of Percoll did not detrimentally affect embryo production and is an alternative protocol for sperm selection. As for the number of cells at 48 hpi, a study performed by Carrocera et al. (2016) demonstrated that embryos having 3–4 or more cells at 44 hpi, developed to morulae and blastocyst at greater rates than embryos having less than three cells at this time. In the present study, for both treatments, the mean number of blastomeres at 48 hpi was greater than three cells.

5. Conclusion

In conclusion, the results of present study indicate that it is possible to optimize the use of sex-sorted semen for IVP by improving methods of sperm selection. The reduction to 100 μ L of each Percoll concentration increased the sperm recovery rate without impairing sperm quality and early embryonic development, thereby enhancing the number of insemination drops/straw and decreasing economic costs.

Conflict of interest

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgements

The authors thank CAPES for financial support to the first author, Alta Genetics Brazil and Dr. Luis Alfredo Garcia Deragon for kindly providing semen samples, and Fernando da Silveira Mesquita for help in reviewing the manuscript.

Reference

- Abraham, M.C., Johannisson, A., Morrell, J.M., 2016. Effect of sperm preparation on development of bovine blastocyst *in vitro*. *Zygote* 24, 825–830.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 2–11.
- Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86, 503–512.
- Alvarez, J.G., Minaretzis, D., Barrett, C.B., Mortola, J.F., Thompson, I.E., 1996. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 65, 400–405.
- Barceló-Fimbres, M., Campos-Chillón, L.F., Seidel, G.E., 2011. *In vitro* fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 495–502.
- Barreta, M.H., Gasperin, B.G., Rissi, V.B., Cesaro, M.P., Ferreira, R., Oliveira, J.F., Gonçalves, P.B., Bordignon, V., 2012. Homologous recombination and non homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. *Exp. Cell. Res.* 318, 2049–2058.

- Bliss, S.B., Voge, J.L., Hayden, S.S., Teague, S.R., Brinsko, S.P., Love, C.C., Blanchard, T.L., Varner, D.D., 2012. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology* 77, 1232–1239.
- Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., Perreault, S.D., 2000. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum. Reprod.* 15, 1322–1328.
- Carrocera, S., Caamaño, J.N., Trigal, B., Martín, D., Díez, C., 2016. Developmental kinetics of *in vitro*-produced bovine embryos: an aid for making decisions. *Theriogenology* 85, 822–827.
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourão, G.B., Dode, M.A., 2010. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 74, 1521–1530.
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Dode, M.A.N., 2014. Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. *Anim. Reprod.* 11, 199–206.
- Cesari, A., Kaiser, G.G., Mucci, N., Mutto, A., Vincenti, A., Fornés, M.W., Alberio, R.H., 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology* 66, 1185–1193.
- Chen, M.J., Bongso, A., 1999. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum. Reprod.* 14, 759–764.
- Dellaqua Jr., J.A., Papa, F.O., Araújo Jr., J.P., Freitas, C.P., Ponchirolli, C.B., Figueiredo, A.S., Melo, C.M., Alberti, K., Crespilho, A.M., Siqueira-Filho, E.R., Orlandi, C., 2006. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 25, 458–460.

- Edwards, R.G., 2003. Aspects of the molecular regulation of early mammalian development. *Reprod. Biomed. Online* 6, 97–113.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871–879.
- Ferré, L.B., Chitwood, J.L., Fresno, C., Ortega, H.H., Kjelland, M.E., Ross, P.J., 2017. Effect of different mini-volume colloid centrifugation configurations on flow cytometrically sorted sperm recovery efficiency and quality using a computer-assisted semen analyzer. *Reprod. Domest. Anim.* 00, 1–8.
- Folchini, N.P., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.R., Martin, D., Spiazzi, C.C., Brum, D.S., 2012. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36, 239–244.
- Gadea, J., Matás, C., Lucas, X., 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 95–108.
- Garner, D.L., Seidel, G.E., 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69, 886–895.
- Guimarães, A.C., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.B., Giotto, A.B., Machado, C.I., Gonçalves, C.G., Folchini, N.P., Brum, D.S., 2014. Reduction of centrifugation force in discontinuous Percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 103–110.
- Harrison, R.A., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343–352.

- Henkel, R.R., Schill, W.B., 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14, 1–108.
- Hollinshead, F.K., Gillan, L., O'Brien, J.K., Evans, G., Maxwell, W.M., 2003. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev.* 15, 351–359.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H., 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683–700.
- Lamirande, E.D., Gagnon, C., 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 21–25.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Castro, M.P.V., Vicente, J.S., 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 64, 1130–1141.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat. Phys. Chem.* 72, 323–331.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., Boland, M.P., 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159–167.

- Lu, K.H., Cran, D.G., Seidel, G.E., 1999. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52, 1393–1405.
- Machado, G.M., Carvalho, J.O., Filho, E.S., Caixeta, E.S., Franco, M.M., Rumpf, R., Dode, M.A., 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71, 1289–1297.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mocé, E., Graham, J.K., Schenk, J.L., 2006. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology* 66, 929–936.
- Morrell, J.M., 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 63–67.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A.M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879–884.
- Mortimer, S.T., 2000. CASA-practical aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- Mortimer, S.T., Maxwell, W.M., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 25–30.
- Nagy, Á., Polichronopoulos, T., Gáspárdy, A., Solti, L., Cseh, S., 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer assisted semen analysis. *Acta Vet. Hung.* 63, 370–381.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Olugbenga, O.M., Olukole, S.G., Adeoye, A.T., Adejoke, A.D., 2011. Semen characteristics and sperm morphological studies of the West African Dwarf Buck treated with Aloe vera gel extract. *Iran J. Reprod. Med.* 9, 83–88.
- Palma, G.A., Olivier, N.S., Neumüller, C., Sinowatz, F., 2008. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anat. Histol. Embryol.* 37, 67–73.
- Papa, P.M., 2015. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology* 83, 107–113.
- Parrish, J.J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J.L., 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859–869.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., First, N.L., 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591–600.
- Prakash, P., Leykin, L., Chen, Z., Toth, T., Sayegh, R., Schiff, I., Isaacson, K., 1998. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil. Steril.* 69, 722–726.
- Rasmussen, S., Block, J., Seidel, G.E.Jr., Brink, Z., Mcsweeney, K., Farin, P.W., Bonilla, L., Hansen, P.J., 2013. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology* 79, 453–461.

- Rodríguez-Villamil, P., Wei, H., Moreira, G., Caccia, M., Fernandez-Taranco, M., Bó, G.A., 2012. Fertilization rates and *in vitro* embryo production using sexed or nonsexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. *Theriogenology* 78, 165–171.
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J., Karadjole, T., 2006. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 237–247.
- Schmidt, H., Kamp, G., 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128, 171–179.
- Seidel, G.E., 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68, 443–446.
- Seidel, G.E., Garner, D.L., 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124, 733–743.
- Silva, P.F., Gadella, B.M., Colenbrander, B., Roelen, B.A., 2007. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology* 67, 609–619.
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P.B., Wolf, E., 2001. Mitochondrial distribution and adenosine content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64, 904–909.
- Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa

selected by single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 390–394.

Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Diez, C., 2012. *In vitro* and in vivo quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 78, 1465–1475.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179.

Waite, J.A., Love, C.C., Brinsko, S.P., Teague, S.R., Salazar, J.L., Mancill, S.S., Varner, D.D., 2008. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70, 704–714.

Wilson, R.D., Fricke, P.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Rutledge, J.J., Penfield, C.M., Weigel, K.A., 2006. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 65, 1007–1015.

Xu, J., Chaubal, S.A., Du, F., 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71, 39–47.

Zalata, A.A., Ahmed, A.H., Allamaneni, S.S., Comhaire, F.H., Agarwal, A., 2004. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J. Androl.* 6, 313–318

Table 1: Mean values (\pm SD) of the characteristics of conventionally processed bull sperm after selection of sperm using 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).

Semen characteristics	Control	P100	P200
Total motility (%)	73.3 \pm 6.83 ^b	80.8 \pm 3.76 ^a	79.2 \pm 4.91 ^a
Vigor (1–5)	3.0 \pm 0.0 ^b	3.7 \pm 0.51 ^a	3.5 \pm 0.54 ^a
Recovery rate (%)	29.0 \pm 5.66 ^b	39.3 \pm 6.86 ^a	36.2 \pm 4.49 ^a
Intact plasma membrane (%)	61 \pm 18.0 ^b	54 \pm 16.6 ^b	76 \pm 11.6 ^a

Different superscripts indicate differences ($P < 0.05$).

Table 2: Mean values (\pm SD) of sperm motility evaluated by the Sperm Class Analyzer system, in sex-sorted semen, selected with 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).

	Control	P100	P200
Total motility (%)	47.7 \pm 6.30	45.3 \pm 11.3	49.8 \pm 9.88
PM (%)	27.8 \pm 6.02	27.0 \pm 5.61	30.2 \pm 9.63
VCL (μ m/s)	34.4 \pm 10.3 ^b	70.2 \pm 13.8 ^a	43.9 \pm 11.8 ^b
VSL (μ m/s)	12.2 \pm 3.93	20.3 \pm 5.25	16.5 \pm 8.11
VAP (μ m/s)	16.3 \pm 4.73 ^b	31.3 \pm 5.23 ^a	22 \pm 8.49 ^b
LIN (%)	37.8 \pm 11.8	28.9 \pm 6.16	37.1 \pm 13.7
STR (%)	74.0 \pm 6.0	64.4 \pm 11.3	72.3 \pm 11.4
WOB (%)	50.5 \pm 11.7	44.8 \pm 2.69	50.1 \pm 10.9
ALH (μ m)	1.3 \pm 0.9 ^b	3.5 \pm 1.71 ^a	1.8 \pm 0.6 ^b
BCF (Hz)	5.2 \pm 2.34	8.7 \pm 4.12	6.2 \pm 2.94

PM = progressively motile sperm; VCL = curvilinear velocity; VSL = straight line velocity; VAP = average path velocity; LIN = linearity; STR = straightness index; WOB = wobbling index; ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat cross frequency. Different superscripts indicate differences ($P < 0.05$).

Table 3. Mean values (\pm SD) of the characteristics of sex-sorted bull sperm after selection with 300 (Control), 100 (P100) or 200 (P200) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).

Semen characteristics	Control	P100	P200
Recovery rate (%)	28.3 \pm 6.17 ^b	46.3 \pm 8.11 ^a	28.8 \pm 5.78 ^b
Intact plasma membrane (%)	65.2 \pm 2.63 ^a	55.8 \pm 9.47 ^b	72.2 \pm 3.06 ^a
Reactive oxygen species (UF)	22.4 \pm 7.43 ^a	10.4 \pm 3.99 ^b	20.4 \pm 7.5 ^a
Lipid peroxidation (nmol MDA/mg protein)	95.2 \pm 38.1	95.7 \pm 27.5	120.4 \pm 27.5
Superoxide dismutase activity (IU)	80.7 \pm 18.7 ^a	41.2 \pm 12.7 ^b	66.7 \pm 21 ^{ab}

Different superscripts indicate differences ($P < 0.05$).

Table 4: Mean values (\pm SD) of total fertilization (TF), normal fertilization (NF) and kinetics of the development up to 48 h post-insemination (hpi) of embryos produced with sex-sorted semen selected with 300 (Control) or 100 (P100) μ L of each Percoll gradient (90%, 60%, and 30%).

Volume	Fertilization (%)				Embryonic Kinetics		
	N	TF	NF	N	Cleavage (%)	Cleavage (hpi)	Cell Number 48 hpi
Control	93	78.5 \pm 4.3	61.3 \pm 5.1	54	81.5 \pm 5.3	32.9 \pm 1.0	4.16 \pm 0.33
P100	94	71.0 \pm 4.7	60.2 \pm 5.1	54	68.5 \pm 6.4	35.1 \pm 0.99	3.77 \pm 0.30

5. CONCLUSÕES

- A redução do volume de Percoll para 100 μ L aumentou a recuperação espermática tanto para o sêmen convencional quanto para o sêmen sexado;
- Na avaliação da cinética espermática, espermatozoides selecionados usando 100 μ L de Percoll apresentaram maior VCL, VAP e ALH;
- O volume de Percoll de 100 μ L reduziu a formação de ROS para o sêmen sexado, apesar de não diferir no sêmen convencional;
- A utilização de 100 μ L não alterou as taxas de fecundação, clivagem, momento da primeira clivagem e número de células às 48 horas pós-inseminação;
- Foi demonstrado que a utilização de 100 μ L de gradientes de Percoll é eficiente na seleção espermática de sêmen sexado, pois aumenta as taxas de recuperação sem prejudicar a qualidade espermática, taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário até 48 horas, permitindo assim, diminuir os custos da PIV.

6. PERSPECTIVAS

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

- Avaliar um maior número de embriões até 48 horas e o desenvolvimento embrionário até estágio de blastocisto, para verificar se a redução do volume de Percoll influenciaria a quantidade e qualidade embrionária;
- Testar a redução do volume de Percoll associada à solução de iodixanol durante a seleção de espermatozoides sexados destinados a PIV de embriões bovinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, L.Y., CHAUBAL, S.A., LIU, Y., CHEN, Y., NEDAMBALE, T.L., XU, J., XUE, F., MORENO, J.F., TAO, S, PRESICCE, G.A., DU, F. Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed *in vitro* fertilization. **J Reprod Dev**, v. 63, p. 175-183, 2017.

ARIAS, M.E., ANDARA, K., BRIONES, E., FELMER, R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. **Reprod Biol**, v. 17, p. 126-132, 2017.

BARCELÓ-FIMBRES, M., CAMPOS-CHILLÓN, L. F., SEIDEL, G. E. *In vitro* fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. **Reprod Domest Anim**, v. 46, p. 495-502, 2011.

BERGER, T., HORTON, M. B. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. **Gamete Res**, v. 19, p. 101-111, 1988.

BERGER, T., PARKER, K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility. **Gamete Res**, v. 22, p. 385-397, 1989.

BERMEJO-ALVAREZ, P., LONERGAN, P., RATH, D., GUTIÉRREZ-ADAN, A., RIZOS, D. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, p. 426-436, 2010.

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

BLONDIN, P. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. **Reprod Fertil Dev**, v. 29, p. 32-36, 2016.

BLONDIN, P., BEAULIEU, M., FOURNIER, V., MORIN, N., CRAWFORD, L., MADAN, P., KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.

BOE-HANSEN, G.B., MORRIS, I.D., ERSBOLL, A.K., GREVE, T., CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.

BOLLENDORF, A., CHECK, J.H., KATSOFF, D., LURIE, D. Comparison of direct swim-up, mini-Percoll, and Sephadex G10 separation procedures. **Arch Androl**, v. 32, p. 157-162, 1994.

BRITO, L. F. C. Avances em la producción de semen sexado. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 12., 2017, Cordoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproduccion Animal, 2017, v.1. p.235-250.

BUSSALLEU, E., PINART, E., RIVERA, M.M., BRIZ, M., SANCHO, S., YESTE, M., CASAS, I., FÀBREGA, A., RIGAU, T., RODRIGUEZ-GIL, J.E., BONET, S. Effects of matrix filtration of low-quality boar semen doses on sperm quality. **Reprod Domest Anim**, v. 44, p. 499-503, 2009.

CARVALHO, J.O. **Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARVALHO, J., SARTORI, R., DODE, M. Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. **Anim Reprod**, v. 11, p. 199-206, 2014.

CARVALHO, J. O., SARTORI, R., LEMES, A.P., MOURÃO, G.B., DODE, M.A.N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesq Agrop Bras**, v.44, 1346-1351, 2009.

CARVALHO, J.O., SARTORI, R., MACHADO, G.M., MOURÃO, G.B., DODE, M.A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

CARVALHO, J. O., SARTORI, R., RODELLO, L., MOURÃO, G.B., BICUDO, S.D., DODE, M.A.N. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, v. 207, p. 30-37, 2018.

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

CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., MILLER, N.G., COCHRANE, D., POLGE, C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. **Vet Rec**, v. 132, p. 40-41, 1993.

DELL'AQUA JR, J.A., PAPA, F.O., ARAÚJO JR., J.P., FREITAS, C.P., PONCHIROLI, C.B., FIGUEIREDO, A.S., MELO, C.M., ALBERTI, K., CRESPILO, A.M., SIQUEIRA FILHO, E. R., ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Sci Vet**, v. 34, p. 205-212, 2006.

ESPINOSA-CERVANTES, R., CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. Sexing sperm of domestic animals. **Trop Anim Health Prod**, v. 45, p. 1-8, 2013.

FOLCHINI, N. P., LEIVAS, F.G., SANTOS, F.W., SCHWENGBER, E. B., MARTIN, D. M., SPIAZZI, C.C., BRUM D.S. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 36, p. 239-244, 2012.

FRIJTERS, A.C., MULLAART, E., ROELOFS, R.M., VAN HOORNE, R.P., MORENO, J.F., MORENO, O., MERTON, J.S. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**, v. 71, p. 64-67, 2009.

GARNER, D. L. Sex-Sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **J Androl**, v. 22, p. 519-526, 2001.

_____. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.

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

GARNER, D. L., SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 886-895, 2008.

GONZALEZ-MARIN, C., LENZ, R. W., GILLIGAN, T. B., EVANS, K. M., GONGORA, C. E., MORENO, J. F., VISHWANATH, R. 191 SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and *in vitro* fertility. **Reprod Fertil Dev**, v. 29, p. 204, 2016.

GOSÁLVEZ, J., RAMIREZ, M.A., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., CRESPO, F., EVANS, K.M., KJELLAND, M.E., MORENO, J.F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. **Theriogenology**, v. 75, p. 197-205, 2011.

GRAFFELMAN, J., FUGGER, E.F., KEYVANFAR, K., SCHULMAN, J. D. Human live birth and sperm-sex ratios compared. **Hum Reprod**, v. 14, p. 2917-2920, 1999.

GRANT, V. J., CHAMLEY, L. W. Sex-sorted sperm and fertility: an alternative view. **Biol Reprod**, v. 76, p. 184-188, 2007.

GUIMARÃES, A.C., LEIVAS, F.G., SANTOS, F.W., SCHWENGBER, E.B., GIOTTO, A.B., MACHADO, C.I., GONÇALVES, C.G., FOLCHINI, N.P., BRUM, D.S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Anim Reprod Sci**, v. 146, p. 103-110, 2014.

HAMANO, K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. **J Reprod Dev**, v. 53, p. 27-38, 2007.

HENKEL, R. Sperm preparation: state-of-the-art physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. **Asian J Androl**, v. 14, p. 260-269, 2012.

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

HOLLINSHEAD, F.K., GILLAN, L., O'BRIEN, J.K., EVANS, G., MAXWELL, W.M. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reprod Fertil Dev**, v. 15, p. 351-359, 2003.

INABA, Y., ABE, R., GESHI, M., MATOBA, S., NAGAI, T., SOMFAI, T. Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of *in vitro* fertilized oocytes in a bull-dependent manner. **J Reprod Dev**, v. 62, p. 451-456, 2016.

JEONG, B. S., YANG, X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v. 59, p. 330-335, 2001.

JO, H.T., BANG, J.I., KIM, S.S., CHOI, B.H., JIN, J.I., KIM, H.L., JUNG, I.S., SUH, T.K., GHANEM, N., WANG, Z., KONG, I.K. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: efficiency and *in vitro* developmental competence. **Theriogenology**, v. 81, p. 675-82, 2014.

JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P., HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biol Reprod**, v. 41, p. 199-203, 1989.

JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P., LOOK, M. V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. **Gamete Res**, v. 17, p. 203-212, 1987.

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

LEE, H.L., KIM, S.H., JI, D.B., KIM, Y.J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **J Vet Sci**, v. 10, p. 249-255, 2009.

LENZ, R. W., GONZALEZ-MARIN, C., GILLIGAN, T. B., DEJARNETTE J. M., UTT, M.D., HELSER, L. A., HASENPUSCH, E., EVANS, K. M., MORENO, J. F., VISHWANATH, R. 190 SexedULTRA™, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves conception rates. **Reprod Fertil Dev**, v. 29, p. 203-204, 2016.

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

LIU, X., HU, T., SUN, W., HAO, H., LIU, Y., ZHAO, X. Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by *in vitro* fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. **Livestock Science**, v. 181, p. 263-270, 2015.

LU, K. H., SEIDEL, G. E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-30, 2004.

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

MATTIOLI, M., BACCI, M.L., GALEATI, G., SEREN, E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, v. 31, p. 1201-1207, 1989.

MITTWOCH, U. Sex determination in mythology and history. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 49, p. 7-13, 2005.

MOCÉ, E., GRAHAM, J. K., SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.

MOROTTI, F., SANCHES, B.V., PONTES, J.H., BASSO, A.C., SIQUEIRA, E.R., LISBOA, L.A., SENEDA, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 696-701, 2014.

MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reprod Domest Anim**, v. 41, p. 63-67, 2006.

MORRELL, J.M., SARAVIA, F., VAN WIENEN, M., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypolytrimethoxysilane-coated silica colloid. **J Reprod Dev**, v. 55, p. 547-552, 2009.

MORTON, K.M., HERRMANN, D., SIEG, B., STRUCKMANN, C., MAXWELL, W.M., RATH, D., EVANS, G., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Mol Reprod Dev**, v. 74, p. 931-40, 2007.

NG, F. L., LIU, D. Y., BAKER, H. W. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. **Hum Reprod**, v. 7, p. 261-266, 1992.

NOGUCHI, M., YOSHIOKA, K., HIKONO, H., IWAGAMI, G., SUZUKI, C., KIKUCHI, K. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. **Zygote**, v. 23, p. 68-75, 2015.

ORD, T., PATRIZIO, P., MARELLO, E., BALMACEDA, J.P., ASCH, R.H. Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. **Hum Reprod**, v. 5, p. 987-988, 1990.

OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. **Gamete Res**, v. 20, p. 159-64, 1988.

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

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.

PRAKASH, P., LEYKIN, L., CHEN, Z., TOTH, T., SAYEGH, R., SCHIFF, I., ISAACSON, K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than *swim-up* in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). **Fertil. Steril.** v. 69, p. 722-726, 1998.

PAVIN, C. I. I. U. M. **Centrifugação com amortecimento durante a seleção espermática na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana.

PEIPPO, J., RÄTY, M., KORHONEN, K., ERONEN, M., KANANEN, K., HURME, T., HALMEKYTÖ, M., MÄKI-TANILA, A. Impact of *in vitro* fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. **Zygote**, v. 18, p. 185-94, 2010.

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

PINKEL, D., GLEDHILL, B.L., LAKE, S., STEPHENSON, D., VAN DILLA, M.A. Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "O" chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. **Science**, v. 218, p. 904-906, 1982.

PONTES, J.H., SILVA, K.C., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P., VIEIRA, P.H., FAIFER, F.S., STERZA, F.A., SCHENK, J.L., SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010.

RASMUSSEN, S., BLOCK, J., SEIDEL, G.E. JR., BRINK, Z., MCSWEENEY, K., FARIN, P.W., BONILLA, L., HANSEN, P.J. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 79, p. 453-461, 2013.

RATH, D., BARCIKOWSKI, S., DE GRAAF, S., GARRELS, W., GROSSFELD, R., KLEIN, S., KNABE, W., KNORR, C., KUES, W., MEYER, H., MICHL, J., MOENCH-TEGEDER, G., REHBOCK, C., TAYLOR, U., WASHAUSEN, S. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. **Reproduction**, v. 145, p. 15-30, 2013.

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

RENS, W., YANG, F., WELCH, G., REVELL, S., O'BRIEN, P.C., SOLANKY, N., JOHNSON, L.A., FERGUSON SMITH, M.A. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. **Reproduction**, v. 121, p. 541-546, 2001.

RODRÍGUEZ VILLAMIL, P., WEI, H., MOREIRA, G., CACCIA, M., FERNANDEZ TARANCO, M., BÓ, G.A. Fertilization rates and *in vitro* embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology**, v. 78, p. 165-71, 2012.

SAKKAS, D., RAMALINGAM, M., GARRIDO, N., BARRATT, C.L. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? **Hum Reprod Update**, v. 21, p. 711-726, 2015.

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

SANG, L., YANG, W.C., HAN, L., LIANG, A.X., HUA, G.H., XIONG, J.J., HUO, L.J., YANG, L.G. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. **J Dairy Sci**, v. 94, p. 2060-2070, 2011.

SARTORI, R., PRATA, A. B., FIGUEIREDO, A. C. S., SANCHES, B. V., PONTES, G. C. S., VIANA, J. H. M., PONTES, J. H., VASCONCELOS, J. L. M., PEREIRA, M. H. C., DODE, M. A. N., MONTEIRO JÚNIOR, P. L. J., BARUSELLI, P. S. Update and overview

on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Anim Reprod**, v. 13, p. 300-312, 2016.

SCHENK, J.L., SUH, T.K., CRAN, D.G., SEIDEL, G.E. JR. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375-1391, 1999.

SEIDEL, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443-446, 2007.

_____. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v. 8, p. 160-164, 2014.

SEIDEL, G. E., GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 733-743, 2002.

SEIDEL JR., G.E., SCHENK, J.L., HERICKHOFF, L.A., DOYLE, S.P., BRINK, Z., GREEN, R.D., CRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-20, 1999.

SUH, T. K., SCHENK, J. L., SEIDEL, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035-1048, 2005.

THOMAS, J.M., LOCKE, J.W.C., VISHWANATH, R., HALL, J.B., ELLERSIECK, M.R., SMITH, M.F., PATTERSON, D.J. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. **Theriogenology**, v. 98, p. 88-93, 2017.

TRIGAL, B., GÓMEZ, E., CAAMAÑO, J.N., MUÑOZ, M., MORENO, J., CARROCERA, S., MARTÍN, D., DIEZ, C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 78, p. 1465-1475, 2012.

VIANA, J. H. M., FIGUEIREDO, A. C. S., SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Anim Reprod**, v. 14, p. 476-481, 2017.

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

WARD, F., RIZOS, D., CORRIDAN, D., QUINN, K., BOLAND, M., LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Mol Reprod Dev**, v. 60, p. 47-55, 2001.

WHEELER, M.B., RUTLEDGE, J.J., FISCHER-BROWN, A., VANETTEN, T., MALUSKY, S., BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219-227, 2006.

XU, J., CHAUBAL, S. A., DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 39-47, 2009.

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

ZHAO, X.M., REN, J.J., ZHAO, S.J., CUI, L.S., HAO, H.S., WANG, H.Y., DU, W.H., QIN, T., LIU.Y., WANG, D., ZHU, H.B. Apoptosis-like events and *in vitro* fertilization capacity of sex-sorted bovine sperm. **Reprod Domest Anim**, v. 49, p. 543-549, 2014.

ZÚCCARI, C. E.S.N., CARRIJO, P.R., LEITE, P. A., SCALDELAI, P. R. R., RODOVALHO, N. C. M., ZANENGA, C.A., KIEFER, C., SILVA, E.V.C. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Rev Bras Saúde Prod An**, v. 9, p. 358-366, 2008.