

PÁBOLA SANTOS NASCIMENTO

**FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* COM SÊMEN SEXADO DE
BOVINOS DA RAÇA 5/8 GIROLANDO**

Garanhuns

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

PÁBOLA SANTOS NASCIMENTO

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* COM SÊMEN SEXADO DE
BOVINOS DA RAÇA 5/8 GIROLANDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Co-orientador: Dr. Antônio Santana dos Santos Filho

GARANHUNS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* COM SÊMEN SEXADO DE
BOVINOS DA RAÇA 5/8 GIROLANDO

Dissertação elaborada por

PÁBOLA SANTOS NASCIMENTO

Aprovada em 28 / 08 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. CLÁUDIO COUTINHO BARTOLOMEU
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr. ANTÔNIO SANTANA DOS SANTOS FILHO
Coorientador - Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA

Prof^ª. Dr.^a. MARIA MADALENA PESSOA GUERRA
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO
EMBRAPA Gado de Leite

DEDICO

*Àquela que é a razão da minha vida e o motivo pelo qual tento ser melhor a cada dia, minha mãe, **María Edilene Santos.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre em primeiro lugar, por todas as graças, bênçãos e oportunidades que tem me proporcionado. Pela presença confirmada em minha vida através de todos os anjos que coloca no meu caminho, muito obrigada PAI!

À minha mãe, Maria Edilene, pelo exemplo de mãe e pessoa, por todo carinho, amor, educação, e principalmente por nunca me deixar desistir, ESSA VITÓRIA É NOSSA!!

À minhas irmãs, Poala e Aline, e ao meu padraastro Luiz, pelo incentivo e apoio a tudo que faço.

Ao meu amor, namorado, amigo e companheiro, Alan, por suportar tudo, por não desistir de mim, por estar sempre comigo e me apoiar.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Cláudio Coutinho, por quem tenho muita admiração e respeito, pela inteligência, ética e profissionalismo. Agradeço pelas oportunidades, por acreditar na minha capacidade, pela orientação e incentivo, pelo respeito e confiança!

Ao meu Co-orientador e amigo Dr. Antônio Santana, pessoa que admiro profundamente e respeito, pela inteligência e sabedoria, e pelo exemplo de ser humano que é! Por toda confiança em mim depositada, pelos conselhos, pelo respeito e carinho com que me trata. Seus ensinamentos não foram apenas para o mestrado, mas para a vida!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pósgraduação em Sanidade e Reprodução de Rumíntes.

Àqueles que viabilizaram a realização do trabalho, a CAPES pela concessão da bolsa de estudos. Estação Experimental do IPA em Arcoverde, ao Dr. Júlio Oliveira, pela viabilização do laboratório. E a todos os trabalhadores que compõem essa estação. À Prof^a. Dr^a. Maria Madalena e a todos que integram o Laboratório de Andrologia e departamento de medicina veterinária - ANDROLAB, da UFRPE. E em especial, Ellen, Eldér e André Mariano, por toda atenção, ajuda e disponibilidade. À Maiana e Lourivaldo, que participaram ativamente do meu experimento, não foi fácil e sem vocês com certeza isso não seria possível!!!

Às amigas, Bete, Talita e Aninha, pela ajuda de sempre, por me acolherem em Garanhuns, pela amizade, amparo e apoio. Aos amigos de pós-graduação Manú e Robespierre pela ajuda e apoio.

Ao meu amigo Diego Gonzaga pela amizade, disponibilidade e colaboração.

À minha “irmã”, Betinha, e a segunda família que fiz em Abreu e Lima, MUITO OBRIGADA DE CORAÇÃO, amo vocês, são presentes de Deus!

Ao meu amigo, “paifessor”, guru, conselheiro e confidente, Hemínio Meneses, pela FORÇA, fundamentos, amizade, pelas palavras certas nos momentos exatos, me transmitiu segurança quando foi necessário. Grande mestre você mora em meu coração!

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Meu mais sincero MUITO OBRIGADA!

"Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos"

Albert Einstein

"Os únicos limites aos seus sonhos são os que você aceita"

Carlos Wizard

RESUMO

O uso de sêmen sexado em conjunto com a produção *in vitro* (PIV) de embriões é um meio potencialmente eficiente na obtenção da descendência com sexo predeterminado. Há anos, os proprietários dos animais desejaram uma metodologia que pré determinasse o sexo da prole para seus rebanhos. As taxas de clivagem, mórula e blastocisto parecem ser afetadas não só pela debilitação provocada na sexagem, mas acredita-se que pelo reprodutor em questão, e por outros fatores que não foram ainda totalmente elucidados, influenciando diretamente na sua utilização com sucesso. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influencia do tipo de sêmen (sexado/convencional) e do touro, nas taxas de blastocisto na PIV de oócitos bovinos obtidos em matadouro, e ainda comparar esses resultados com as análises da cinética espermática. Oócitos (N= 959) foram maturados, fertilizados com sêmen sexado e convencional de três touros da raça 5/8 Girolando. Uma palheta de cada tipo de sêmen foi avaliada com uso da “computer-assisted sêmen analysis” (CASA) e da microscopia de fluorescência. Foram realizadas três repetições durante o experimento. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 16.0 empregando-se a análise de variância (ANOVA). O teste t-Student foi usado para detectar diferenças entre os grupos. O Qui-quadrado foi utilizado para análise dos resultados da produção de embriões. Para todas as análises, os valores foram considerados significativos ($P < 0,05$). Os resultados diferiram entre o sêmen convencional (31,06) e sexado (21,10%) para produção de blastocisto. Quando comparamos a produção de blastocisto individualmente nas amostras de sêmen sexado (27,69%; 17,93% e 25,56%, touros 1, 2 e 3 respectivamente) percebemos que $T2 < T1$ e $T1=T3$ e $T2=T3$. Concluímos que no presente trabalho o sêmen sexado foi menos eficiente na produção de blastocisto quando comparado ao sêmen convencional de forma geral e do mesmo touro. As análises da cinética espermática bem como as sondas fluorescentes foram compatíveis com o potencial fertilizante das amostras de sêmen sexado e convencional em touros da raça 5/8 Girolando.

Palavras chave: blastocisto, CASA, produção *in vitro*.

ABSTRACT

The use of sexed semen for in vitro embryo production (IVP) is a potentially effective means for obtaining the progeny with predetermined sex. For years, animal owners wanted a methodology that pre determine the sex of offspring for their herds. Rates of cleavage, morula and blastocyst seem to be affected not only by the damages caused by sexing, but it is believed that the bull factor, and other aspects that have not been fully elucidated, directly influencing its successful use. The aim of this study was to evaluate the influence of type of semen (sexed /conventional) and a bull factor over blastocyst rates when submitting bovine oocytes obtained from slaughterhouse to IVP, and also compare these results with analyzes of sperm kinetics. Oocytes (n = 959) were matured, fertilized with sexed and non-sexed semen from three 5/8 Girolando bulls. A straw of each type of semen was assessed with use of "computer-assisted semen analysis" (CASA) and fluorescence microscopy. Three replicates were performed during the experiment. Data were analyzed by SPSS 16.0 statistical program employing analysis of variance (ANOVA). The Student t test was used to detect differences between groups. The Chi-square test was used to analyze the results of embryo production. For all analyzes, values were considered significant ($P < 0.05$). The results differed between sexed (21.10%) and non-sexed semen (31.06%) to blastocysts production. We conclude that in the present work sexed semen was less efficient in producing blastocyst when comparing non-sexed semen of the same bulls and when comparing semen types (sexed and non-sexed) from the same bull. Analyses of sperm kinetics and fluorescent probes were compatible with the fertilizing potential of samples of sexed and non-sexed semen of 5/8 Girolando bulls.

Key Words: blastocyst, CASA, in vitro production.

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Comparação entre diferentes estadios de desenvolvimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> com sêmen sexado e convencional de três touros da raça 5/8 Girolando. Arcoverde-PE, 2013.....	34
Tabela 2.	Análise comparativa do sêmen convencional, sexado e convencional x sexado de três touros 5/8 Girolando quanto às variáveis da cinética espermática. Recife – PE, 2013.....	35
Tabela 3.	Médias e erros-padrão da preservação de estruturas dos espermatozoides do sêmen convencional e sexado de três touros 5/8 Girolando.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALH - Deslocamento lateral da cabeça

ANOVA – Análise de variância

BCF - Frequência de batimento de cauda

CASA - Computer-assisted sêmen analysis

CFDA - Diacetato de carboxifluoresceína

CIV - Cultivo *in vitro*

DMSO - Dimetilsulfóxido

FITC-PNA - Conjugado de isotiocinato aglutin fluoresceína

FIV - Fertilização *in vitro*

JC-1 - 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine,iodide

LIN - Linearidade

MIV - Maturação *in vitro*

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PBS - Solução salina fosfatada e tamponada

PI - Iodeto de propídeo

PIV - Produção *in vitro*

PS - Puro Sintético

STR - Retilneariade

T1 - Touro 1

T2 - Touro 2

T3 - Touro 3

VAP - Velocidade de trajeto

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade linear

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral.....	14
2.2	Específicos.....	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	5/8 Girolando.....	15
3.2	Produção <i>in vitro</i>	16
3.3	Método de Seleção espermática pelo Gradiente de Percoll a 90%.....	18
3.4	Sêmen Sexado.....	19
3.5	Métodos de avaliação do sêmen.....	20
4.	REFERÊNCIAS	22
5.	ARTIGO CIENTÍFICO - FERTILIZAÇÃO IN VITRO COM SÊMEN SEXADO E CONVENCIONAL DE TOUROS 5/8 GIROLANDO	25
6.	APÊNDICES.....	42
7.	ANEXO.....	47

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de leite, em 2008, chegou a mais de 578 bilhões de litros. O Brasil aparece como o 6º maior produtor, com mais de 27 bilhões de litros em 2008 e 30,7 bilhões em 2010 (IBGE, 2010). A participação da região nordeste brasileiro em relação à produção nacional ganhou força na última década, sendo a terceira região que mais cresceu em participação neste período - cerca de 69%, desses, Pernambuco ocupa o segundo lugar, registrando um rebanho bovino de dois milhões de cabeças, o que demonstra seu importante papel na economia regional (ALVES *et al.*, 2010).

A produção de leite, principal fonte de renda na microrregião do Vale do Ipanema-PE, advinda em sua maior parte pela raça Girolando em graus de sangue variados, está vinculada à parição, tendo-se como objetivo primordial, alcançar a máxima produção de leite/vaca/dia. Caso a concepção seja atrasada, a ineficiência reprodutiva pode levar à redução na produção de leite, comprometendo economicamente a atividade (MOTA; SANTOS, 2008). Deste modo, tornam-se vitais estudos que intensifiquem e melhorem cada vez mais a produtividade do rebanho através de programas de controles reprodutivos e de melhoramento genético animal.

Na busca pela maximização produtiva do rebanho, biotecnologias vêm ganhando espaço, já que possibilitam a obtenção de animais que expressam mais rapidamente características almejadas para a atividade pecuária em questão (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Existe relação entre a biotécnica adotada e a categoria animal, a exemplo, inseminação artificial (IA) que é importante disseminadora de genes de machos considerados superiores, por outro lado, a transferência de embriões (TE), que permite aproveitar melhor matrizes com genética eminente, aumentando, em até 10 vezes, o número de crias/ano. Abrangendo tanto reprodutores quanto matrizes superiores, a fertilização *in vitro* (FIV), abre novas perspectivas no aproveitamento de animais com reconhecido valor zootécnico (DODE, 2004).

A sexagem somada à FIV otimiza os produtos concebidos, porém, a técnica de sexagem debilita os espermatozoides, deixando-os mais sensíveis devido ao estresse químico e físico aos quais são expostos, o que diminui sua capacidade de fecundação e

gera menores taxas de desenvolvimento embrionário comparados aos não-sexados no entanto, as razões específicas das baixas taxas de fertilidade do sêmen sexado não são totalmente conhecidas. (SEIDEL, 2003).

A maior parte do rebanho no estado de Pernambuco é formado pela raça mestiça Girolando, sendo o comércio do leite e seus derivados a principal fonte de renda dos pequenos e grandes pecaristas, tendo alguns municípios como Itaíba (16º), Buíque (24º) e Pedra (39º) destacados no cenário nacional no ranking dos 50 municípios de maior produção leiteira do país (ALVES *et al.*, 2010), e vislumbrando na FIV possibilidades de expandir esse potencial produtivo, fazem-se necessários estudos que expliquem e minimizem a frequente instabilidade nos resultados da FIV já vistas em outras raças tais como: a utilização do sêmen sexado e a influência do touro na variação das taxas de produção de blastocisto (MARQUES *et al.*, 1995).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de clivagem, e blastocistos produzidos com sêmen sexado e convencional de três reprodutores da raça 5/8 Girolando a partir da sua utilização na fertilização *in vitro* de oócitos oriundos de ovários obtidos em abatedouros, e associá-las às análises do sêmen (CASA e Fluorescência).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a eficiência do sêmen sexado e convencional de três touros da raça 5/8 Girolando na FIV de oócitos bovinos obtidos em matadouro;

2.2 Específicos

Comparar a taxa de clivagem e a produção de blastocisto obtida com o sêmen sexado e convencional entre três touros;

Avaliar a influencia que o reprodutor tem sobre o resultado da FIV;

Observar, através da análise cinética e estrutural, se a qualidade do sêmen condiz com os seus respectivos resultados *in vitro*;

Observar se alguma característica cinética, em particular, tem maior influência sobre a FIV;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 5/8 Girolando

O gado de leite no país é composto em sua maior parte de raças mestiças, e destas, 50% são de cruzamentos entre Gir e Holandês em vários graus de sangue (FREITAS *et al.*, 2002). Os primeiros cruzamentos ocorreram na década de 40 e os produtos desses cruzamentos se destacavam pela excelente produtividade, alta fertilidade e vigor (SILVA, *et al.*, 2012). O programa Girolando teve início em 1989, mas só foi oficializado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA em 1996, e um ano depois deu-se início ao teste de progênie (FREITAS *et al.*, 2002), sendo uma parceria da Girolando com a Embrapa Gado de Leite (SILVA, *et al.*, 2012).

O maior impulso para a criação do Girolando se deu através do desejo de agregar a rusticidade do Gir ao potencial produtivo do Holandês (FREITAS *et al.*, 2002). No ano de 2007 foi implantado o Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando (PMGG), e desde então seus resultados demonstram que hoje essa é a raça que mais cresce na venda de sêmen no Brasil chegando à marca de mais de 400.000 doses comercializadas no ano de 2011, com um aumento de 48,45% em relação ao ano de 2010. Outro dado importante a ser ressaltado é o crescente aumento na produção leiteira das vacas primíparas, que representa um incremento de 15,7%, na produção leiteira (SILVA, *et al.*, 2012).

Existem, desde o seu surgimento, vários graus de sangue. No entanto os cruzamentos são direcionados para fixar o padrão racial no grau de sangue 5/8 HOL + 3/8

G. Os animais advindos do acasalamento entre indivíduos 5/8 são considerados como Puro Sintético (PS) da Raça Girolando, ou seja, a raça propriamente dita. Para um animal receber o registro definitivo de PS, além de ele ser produto do acasalamento entre animais 5/8, o mesmo deve possuir avaliação genética positiva para produção de leite (PTA leite), esta podendo ser obtida por meio do desempenho próprio ou pelo desempenho de seus pais (SILVA, *et al.*, 2012).

A raça Girolando tem expandido vertiginosamente pelo país, colaborando na formação e desenvolvimento de novas bacias leiteiras, que estão embasadas na lucratividade da atividade, reduzindo os custos de produção e melhorando a produtividade desses rebanhos (MENESES, 2000), porém o subsídio literário embasado em pesquisas na área de biotecnologia reprodutiva desenvolvida com Girolando 5/8 merece incremento e enfoque pelo papel importante na pecuária nacional.

3.2 Produção *In Vitro* – PIV

A interação espermatozóide-oócito é intitulada como fertilização com a formação de um novo indivíduo. *In vitro*, corresponde à combinação de processos necessários à produção de embriões em laboratório, envolvendo a maturação de oócitos imaturos aspirados dos ovários, capacitação espermática, fecundação dos oócitos e cultivo de embriões até o estágio de blastocisto, quando estão prontos para serem transferidos para as fêmeas receptoras (HAFEZ, 2004).

A grande maioria dos laboratórios tem utilizado o Tissue Culture Medium (TCM) como meio de maturação *in vitro* (MIV) para oócitos bovinos. A suplementação com o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) é de extrema importância, enquanto a suplementação de estrógeno nos meios MIV é opcional de cada laboratório (VARAGO *et al.*, 2008). Feita em 24h, a fase de maturação precisa ser eficiente para maturar o núcleo e citoplasma, e assim adquirir competência para o momento da fecundação (CHAVES *et al.*, 2010).

A origem da FIV se deu na busca de ferramentas para estudar e entender processos de fecundação e desenvolvimento embrionário, mais tarde, serviu para resolver casos de infertilidade, principalmente em humanos. O primeiro animal produzido desta técnica foi

um coelho na década de 50. E o primeiro bezerro veio a partir de um oócito ovulado, nasceu em 1981 nos Estados Unidos. O procedimento envolveu laparotomia médio-ventral, para resgatar o oócito e transferir os zigotos para uma receptora. A partir desse experimento, a técnica avançou consideravelmente e nos dias atuais, associados à maturação *in vitro* de oócitos, tem sido utilizada para produção de grande número de embriões de fêmeas com idades e estados fisiológicos diferentes, que são usados para pesquisa ou para produção comercial (DODE, 2004).

A FIV também é uma técnica fundamental para o uso de todas as novas biotécnicas da reprodução animal, pois possibilita a produção de embriões pré-sexados e embriões ou zigotos em vários estágios de desenvolvimento, para os estudos de transgênese e clonagem. Uma das dificuldades enfrentadas que precisam ser superadas nos estudos dessa técnica é a grande variação nos resultados na produção de blastocisto, taxas em torno de 30 a 50% de prenhez, que pode ser por interferência não só da doadora, mas também do sêmen utilizado (DODE, 2004).

Ao que se refere à obtenção de oócitos para a fertilização *in vitro*, o método de aspiração *in vivo*, é ainda de fundamental importância para produzir embriões de vacas prenhes, daquelas que não respondem à superovulação, das portadoras de patologias reprodutivas adquiridas, senis ou pré-púberes (GONÇALVES, 2008). Outra forma de aquisição de oócitos é através de ovários de abatedouro, técnica bastante adequada para pesquisas científicas sendo proibida a inovulação desses produtos, tendo em vista a falta de informações quanto às condições sanitárias dos animais abatidos, podendo gerar consequências indesejáveis no rebanho receptor (TEIXEIRA *et al*, 2007).

Ao tempo em que a FIV permite a seleção dos melhores gametas, via manipulações, é válido frisar que em paralelo a esse processo, essas células vão sofrendo diversas alterações que interferem em sua viabilidade e competência para posterior desenvolvimento embrionário (SALAMON; MAXWELL, 1995).

Qualquer processo de produção, por mais simples que seja, segue uma conduta determinada. Os procedimentos para PIV já estão relativamente definidos. Os meios e os métodos empregados são bastante similares entre os laboratórios (VARAGO *et al* ., 2008). Entretanto, os percentuais de produção de embriões, a qualidade e a capacidade de produzir gestação são variáveis (MARQUES *et al.*, 1995).

O emprego da FIV se faz útil em caso de fêmeas com distúrbios reprodutivos adquiridos que inviabilizam a produção de descendentes, e ainda permite o aumento do potencial de exploração zootécnico de fêmeas de genética superior em menor período de tempo. As aspirações ocorrendo com periodicidade, obtendo índices de produção de 40%, seu rendimento pode superar aquele obtido pela TE, e a relação custo/benefício é justificável (VARAGO *et al.* , 2008).

3.3 Método de seleção espermática pelo Gradiente de Percoll a 90%

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfológicamente normais (VERTEGEN, *et al.*, 2002) o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro*. Dentre as técnicas de capacitação o gradiente de Percoll é o mais utilizado.

Para maximizar a capacidade fecundante da amostra do sêmen com o mínimo de poliespermia, testes com diferentes concentrações inseminantes devem ser realizados. Como a aplicabilidade destes testes em laboratórios comerciais não é muito prática, a concentração geralmente utilizada é a de 2×10^6 espermatozoides/ml, calculada de acordo com a motilidade e a população viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente de Percoll (GONÇALVES, 2008).

Machado (2009) utilizando diferentes volumes de Percoll, tempo e força de centrifugação não observou diferença na qualidade espermática, desenvolvimento embrionário e proporção de embriões machos e fêmeas, confirmando sua indicação para a FIV.

3.4 Sêmen Sexado

É possível adquirir doses de sêmen com frações enriquecidas de espermatozoides contendo cromossomos sexuais de um dado tipo, sêmen sexado. Sabendo-se que o sexo do produto é um fator determinante para o desempenho produtivo e econômico da atividade há necessidade de pesquisas que permitam o melhor aproveitamento desse tipo específico de sêmen (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

O potencial de fertilização de uma amostra de sêmen pode ser obtido pela análise das características seminais correlacionando os resultados com a técnica de FIV (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar esse potencial fecundante peculiar, e a maioria dos resultados mostram divergências entre os tipos de sêmen (sexado/convencional), raça, reprodutores utilizados, partidas e palhetas de um mesmo animal (MARQUES *et al.*, 1995; BLONDIM *et al.*, 2009; MACHADO, 2009).

Na inseminação artificial com sêmen sexado ou não sexado nota-se que alguns touros apresentam menores diferenças na taxa de concepção. Essa informação tem relevância na aplicação prática, pois possibilita a seleção de touros de maior desempenho após sexagem (NEVES *et al.*, 2009). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação devido ao processo de separação por citometria de fluxo (CARVALHO *et al.*, 2009).

A criopreservação do sêmen é uma técnica de uso rotineiro, pois permite seu armazenamento e aumento da vida útil. Todavia, os mesmos podem apresentar uma diminuição de, em média, 50% de viabilidade da população espermática devido a modificações em seus fatores bioquímicos e/ou morfológicos (SEIDEL, 2003).

O uso do sêmen sexado apresenta algumas limitações como: cerca de 60% podem ser excluídos por danos ou por perdas no processo, velocidade de separação, baixa concentração das doses, valor elevado quando comparado ao não sexado. Esses fatores diminuem sua utilização na IA tradicional, mas é menos limitante para a PIV, pois 30 ovócitos podem ser fecundados em um volume de aproximadamente 100 microlitros,

contendo de 100 a 200 mil espermatozoides (MARTINS *et al.*, 2007). No entanto o uso do sêmen sexado na PIV tem demonstrado ser possível (MACHADO, 2009).

3.5 Métodos de Avaliação do Sêmen

Os parâmetros clássicos para avaliação de uma amostra de sêmen (fresco, resfriado ou congelado) se baseiam em métodos imprecisos, devido à natureza subjetiva dos testes e da variabilidade entre técnicos (ARRUDA *et al.*, 2007). Mais recentemente, trabalhos descrevem a adoção de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, como a exemplo o CASA (Computer-assisted sêmen analysis), que é um sistema automatizado (hardware e software) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozoides, capaz de processar e analisar as imagens e fornecer informações precisas sobre a cinética de células individuais, e também fazer uma estimativa estatística da população (RUPERT *et al.*, 2004).

Um único teste é pouco eficaz em virtude dos espermatozoides apresentarem múltiplos compartimentos com diferentes funções a serem avaliadas, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para aferir o potencial de fertilização das amostras de sêmen (MAZIERO *et al.*, 2009).

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides é geralmente sinônima de espermatozoide viável (GRAHAM; MOCÉ, 2005). As preparações que empregam a combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas por microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, conferem especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais, e destacam-se como as mais utilizadas na determinação da integridade estrutural dos espermatozoides (ARRUDA *et al.*, 2007). A Eosina-nigrosina são corantes comumente usados para esfregaços secos de esperma, enquanto que a combinação de diacetato de carboxifluorosceína (CFDA) com iodeto de propídio (PI), são normalmente usados para corar esfregaços molhados. O iodeto de propídeo é uma molécula fluorescente que entra no núcleo de uma célula em que a membrana plasmática está danificada, corando de vermelho, e o CFDA é um substrato

incolor que é rapidamente convertido por esterases intracelulares para um verde fluorescente, corando de verde as células íntegras (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

Em virtude do seu papel biológico, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade. Atualmente a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência por sondas como 5,5', 6, 6'-tetrachloro-1,1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) que permitem a distinção entre espermatozóides com baixa (fluorescem em verde) e alta função mitocondrial (fluorescem em laranja) (THOMAS *et al.*, 1998).

Um espermatozóide deve manter um acrossoma intacto até ao momento em que se liga à zona pelúcida do oócito e sofre a reação acrossômica, liberando enzimas que permitem a fusão com a membrana do oócito (HAFEZ, 2004). A determinação de sua integridade pode ser adquirida pela combinação de sondas fluorescentes como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) que apresentam capacidade de ligação a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (ARRUDA *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS

ALVES, Alexandre (Ed.). Boletim Setorial do Agronegócio, Bovinocultura Leiteira. Recife, PE, 2010.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R., RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

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.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.10, p.1346-1351, out. 2009.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R.. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v.34, n.1, p.37-49, 2010.

DODE, M.A.N. . Fecundação *in vitro*: para o melhoramento animal. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 2004. Disponível em: <http://portaledit.sct.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2439664009>. Acesso em 3 out. 2013.

FREITAS, Ary Ferreira de. (Ed.). **Girolando: raça tropical desenvolvida no Brasil**, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Juiz de Fora, MG, 2002.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E.. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2ª ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ B. **Transporte e sobrevivência de gametas**. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B., Reprodução Animal, 7ª Ed., Barueri-SP: Manole, 2004. cap. 23, p. 146-166.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo Agropecuário 2010*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>> Acesso em: 05 mai. 2012.

MACHADO, G. M. **Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões bovinos**. 2009. 67 f. Dissertação - Ciências Animais, Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2009.

MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; PEREIRA, R.M.; VASQUES, M.I.; LOPES DA L.F. C.; HORTA A.E.M. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fertilização *in vitro* e desenvolvimento de embriões em co-cultura. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Lisboa, n. 2, p. 103-110, out. 1995.

MARTINS, A. P. M.. **O papel da técnica de transferência embrionária no resultado dos ciclos de fertilização in vitro**. 2007. 101 f. Dissertação - Saúde da Criança e da Mulher, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

MAZIERO, R. R. D.; CRESPILO, A. M.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira Reprodução Animal Supl.**, Belo Horizonte, n.6, p.5-10, 2009.

MENEZES, C. R. Â. DE. Programa de melhoramento do Girolando. In: III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2000. Disponível em: <http://sbmaonline.org.br/anais/iii/palestras/pdfs/iiip29.pdf> . Acesso em 15 mar. 2014.

MOTA M.F. ; SANTOS G.T. **Eficiência Reprodutiva em bovinos de leite**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR. 2008. Disponível em: < <http://www.nupel.uem.br/eficiencia-reprodutiva.pdf>> Acesso em 15 mar. 2014.

NEVES, H.H.R.; CARVALHEIRO, R.; FRIES, L.A.; QUEIROZ, S.A. .Uso Combinado de Sêmen Sexado e Acasalamento Dirigido sobre uma População de Bovinos de Corte Submetida a Seleção: Estudo de Simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2368-2374, 2009.

RUPERT P. AMANN; DAVID F. KATZ. Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, v.25, n. 3, p. 317-325, May/June, 2004.

SÁ FILHO, M.F.; SOUZA A.H.; MARTINS C.M.; SALES J.N.S.; CREPALDI, G.A.; BARUSELLI, P.S. **Avanços nos Protocolos Reprodutivos em Fêmeas Bovinas Utilizando Sêmen Sexado**. São Paulo, Brasil. 2010. Disponível em: <

http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Avancos-Sexado_Baruselli.pdf> Acesso em 15 mar. 2014.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36, 1995.

SEIDEL, JR. GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.585-598, 2003.

SILVA, MARCOS VINICIUS G. BARBOSA DA (Ed.). **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando – Sumário de Touros – Resultado do Teste de Progênie - Julho/2012** /. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2012.

TEIXEIRA, T.F.; SOUZA, N.M.; MACEDO, A.T.M.; CAMPOS, M.D.S.M.; AZEVEDO, M.V.; FREITAS, B.C.; ALVES, J.D.R.A.; OLIVEIRA, M.A.L.. **Maturação e Fertilização *in vitro* de Oócitos Caprinos Utilizando Espermatozoides Sexados**. Recife 2007. Disponível em: <
<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0217-1.pdf>> Acesso em 15 mar. 2014.

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

VARAGO, F. C., MENDONÇA, L. F., LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

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

5. ARTIGO CIENTÍFICO

FERTILIZAÇÃO IN VITRO COM SÊMEN SEXADO E CONVENCIONAL DE TOUROS 5/8 GIROLANDO

Resumo

O objetivo foi comparar o resultado da produção embrionária alcançada pelo sêmen sexado e convencional de três touros 5/8 Girolando associando às análises da cinética espermática. Um total de 959 óocitos (sexado, n= 473; convencional, n = 486), maturados, fertilizados e cultivados tiveram a taxa de clivagem observada no D2 e de blastocistos no D7. Para avaliação cinética foi utilizado o CASA, e sondas fluorescentes para verificação da integridade do espermatozóide. Os dados foram analisados pelo programa SPSS 16.0 empregando a análise de variância (ANOVA), sendo o teste t-Student usado para detectar diferenças entre os grupos e o Qui-quadrado utilizado para análise dos resultados da produção *in vitro* ($P < 0,05$). Os resultados diferiram entre o sêmen convencional (31,06) e sexado (21,10%) para produção de blastocisto. Quando comparamos a produção de blastocisto individualmente nas amostras de sêmen sexado (27,69%; 17,93% e 25,56%, touros 1, 2 e 3 respectivamente) percebemos que $T2 < T1$ e $T1=T3$ e $T2=T3$. Concluímos que o sêmen sexado foi menos eficiente na produção de blastocisto quando comparado ao sêmen convencional. As análises de cinética e de integridade foram compatíveis com o potencial fertilizante das amostras de sêmen em touros da raça 5/8 Girolando.

Palavras-chave: blastocisto, bovino, CASA.

IN VITRO FERTILIZATION WITH SEXAD AND NON-SEXAD SEMEN OF 5/8 GIROLANDO BULLS

Abstract

The objective was to compare the outcome of embryo production achieved by conventional and sexed semen from three bulls 5/8 Girolando associating the analyzes of sperm kinetics. A total of 959 oocytes (sexed, n = 473, conventional, n = 486), matured, fertilized and cultured had the cleavage rate observed in D2 and D7 in blastocysts. For kinetic evaluation CASA, and fluorescent probes to check the integrity of sperm was used. Data were analyzed by SPSS 16.0 using analysis of variance (ANOVA) and Student's t-test used to detect differences between groups and chi-square used to analyze the results of the *in vitro* production ($P < 0.05$). The results differed between conventional semen (31.06) and sexed (21.10%) to blastocyst. When comparing the blastocyst individually in samples of sexed semen (27.69%, 17.93% and 25.56%, bulls 1, 2 and 3 respectively) realize that $T2 < T1$ and $T1=T3$ e $T2=T3$. We conclude that the sexed semen was less efficient in producing blastocyst when compared to conventional semen. The analysis of kinetic and integrity were consistent with the fertilizing potential of semen samples in 5/8 Gir breed bulls.

Keywords: blastocyt, bovine, CASA.

INTRODUÇÃO

A raça Girolando tem expandido vertiginosamente pelo país, colaborando na formação e desenvolvimento de novas bacias leiteiras, principal fonte de renda na microrregião do Vale do Ipanema-PE, que estão embasadas na lucratividade da atividade, que tem como objetivo primordial, alcançar a máxima produção de leite/vaca/dia¹. Caso a concepção seja atrasada, a ineficiência reprodutiva pode levar à redução na produção de leite, comprometendo economicamente a atividade. Porém o subsídio literário embasado em pesquisas na área de biotecnologia reprodutiva desenvolvida com a raça pura sintética Girolando 5/8 merece incremento e enfoque pelo papel importante na pecuária nacional.

Na tentativa de ampliar o potencial reprodutivo, resolvendo, em alguns casos, a própria infertilidade, adveio a fertilização *in vitro* (FIV), sendo esta uma das técnicas mais avançadas em que consistem as novas biotécnicas da reprodução animal. No entanto uma das dificuldades enfrentadas que precisam ser superadas nos estudos dessa técnica é a grande variação nos resultados na produção de blastocisto, taxas de prenhez, que pode ser resultado da interferência não só da doadora, mas também do sêmen utilizado².

A sexagem do sêmen utilizado na FIV otimiza os produtos concebidos, porém, a técnica de sexagem debilita os espermatozoides, deixando-os mais sensíveis devido ao estresse químico e físico aos quais são expostos durante o processo de sexagem, diminuindo sua capacidade de fecundação e conseqüentemente produzindo menores taxas de desenvolvimento embrionário, quando comparados aos não-sexados³. As razões específicas das baixas taxas de fertilidade do sêmen sexado não são totalmente conhecidas. Desde 1940 cientistas reconhecem a necessidade de obter informações objetivas acerca da porcentagem de espermatozoides móveis (de um ejaculado/de uma palheta). Pois acredita-se que a obtenção de dados precisos sobre o movimento espermático poderia ser utilizada para prever o potencial de fertilidade de um macho ou selecionar o “melhor” procedimento para a preparação do sêmen⁴.

O potencial de fertilização de uma amostra de sêmen pode ser obtido pela análise das características seminais correlacionando os resultados com a técnica de FIV⁵. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar esse potencial fecundante

peculiar e a maioria dos resultados mostram diferenças entre os tipos de sêmen (sexado / convencional), raça, reprodutores utilizados, partidas e palhetas de um mesmo animal^{6,7}.

A utilização de análises computadorizadas e sondas fluorescentes por meio de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo são métodos que vem sendo amplamente utilizados nos últimos anos em diversas espécies^{8,9}, incluindo humanos¹⁰, pois estes procedimentos certificam com maior acurácia a qualidade do sêmen na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional¹¹.

Testes laboratoriais são utilizados como critério para excluir amostras de sêmen de baixo potencial fecundante¹², no entanto, o grande desafio seria apontar, dentre as diversas variáveis obtidas pelo CASA aquelas que teriam uma maior influencia sobre o potencial de fertilidade¹³, e dentre os animais férteis, aqueles que suportariam os danos causados pela técnica de sexagem mantendo sua capacidade fecundante³. Sua adoção na rotina poderia ajudar no diagnóstico do que está atualmente classificado como infertilidade inexplicável¹².

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar a taxa de blastocistos produzidos com sêmen sexado e convencional de três touros da raça 5/8 Girolando a partir da sua utilização na fertilização *in vitro* de oócitos provenientes de ovários obtidos em abatedouros, associando-os as análises laboratoriais (CASA e sondas fluorescente).

MATERIAL E MÉTODOS

Suplemento

A menos que seja indicado de outra forma, todos meios de cultura (maturação, capacitação, fertilização, cultivo e os “feedings”) utilizados são meios comerciais produzidos na Gene Up – Biotecnologia em Reprodução Animal (Presidente Prudente, SP, Brasil).

Todos os meios utilizados na produção *in vitro*, durante todas as etapas, foram estabilizados em estufa com 5% de CO₂ e atmosfera úmida à 38,5 °C over night.

Produção In Vitro- PIV

Local do experimento

O experimento foi realizado entre os meses de julho à dezembro de 2013, na Estação Experimental do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), localizada no município de Arcoverde, que está localizado a uma latitude 08°25'08" sul, longitude 37°03'14" oeste, estando a uma altitude de 663 metros, no sertão pernambucano, clima semiárido, precipitação pluviométrica de 694,2mm e uma temperatura média anual de 23,75°C.

Obtenção dos ovários

Os ovários de fêmeas bovinas foram coletados no matadouro dos municípios de Arcoverde e Pedra, imediatamente após o abate e transportados em garrafa térmica contendo solução fisiológica a 0,9% e 30mg de sulfato de gentamicina a temperatura de 37°C para o Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA).

Recuperação e Seleção dos oócitos

No laboratório os ovários foram lavados de 2 a 3 vezes com solução salina fosfatada e tamponada (PBS) e colocados em banho maria à 37°C. Os folículos entre 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com seringa de 10mL e agulha hipodérmica 40x12, o aspirado foi alocado em um tubo cônico de 50 mL. Após 5 minutos de espera, para decantação, o sobrenadante foi desprezado e, posteriormente adicionado 10 mL de PBS. O conteúdo foi colocado em uma placa de Petri com fundo riscado para facilitar a busca dos complexos *cumulus* – oócito (COC's), com auxílio da lupa. Utilizando-se apenas os COC's com citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células do *cumulus* compactas, classificados como grau 1.

Maturação in vitro – MIV

Os oócitos, num total de 959 (sêmen sexado = 473 e sêmen convencional = 486), após a seleção foram lavados em 3 gotas de 100 µl de meio TALP, divididos em grupos de 15 estruturas por gota e seguiram para maturação durante 24 horas em atmosfera saturada

de umidade com 5% de CO₂ à 38,5°C, em uma placa de Petri de 35mm com 4 gotas de 100µl com meio TCM 199 cobertas com quatro mililitros de óleo mineral estéril.

Seleção Espermática

O sêmen sexado e convencional dos três touros da raça Girolando foram selecionados pelo método de Gradiente descontínuo de Percoll a 90%. As palhetas de sêmen sexado e convencional de cada touro, provenientes da CRV Lagoa – Sertãozinho/SP, foram submetidas ao teste ao mesmo tempo e cada tipo foi usado para fertilizar duas gotas contendo 15 oócitos cada. Para realização do método de Gradiente de Percoll a 90% descontínuo foi utilizado eppendorf de um e meio mL onde foram adicionados 250 µl de Percoll 90% no fundo e logo acima 125 µl de Percoll 90% misturado com mais 125 µl de meio TALP, formando um Percoll 45% e acima dessa solução a palheta descongelada do sêmen em questão. Todas as palhetas foram descongeladas em descongelador de sêmen eletrônico à 37 °C por 30 segundos. Após a formação do gradiente descontínuo o eppendorf seguiu para a microcentrifuga a 9400rpm durante 7 minutos, feito isso o sobrenadante foi retirado, sendo o pellet resuspendido em um mililitro do meio FERT- TALP contendo heparina (0,00003 g/mL), sendo novamente levado para a centrifuga com mesma rotação e tempo.

Concentração espermática

A concentração espermática foi alcançada através de um cálculo feito com base na motilidade espermática e concentração de espermatozoides na câmara de Neubauer.

Para determinação da motilidade espermática foi utilizado 5 µl do pellet após a capacitação, diluído em 95 µl de meio FERT- TALP em um eppendorf de um e meio mL de onde, após homogeneização, foi retirado 5 µl colocados em lâmina e coberto por lamínula, sendo então levado ao microscópio para determinação do percentual de motilidade. Após a determinação sairá do mesmo eppendorf a dose inseminante.

Para a contagem na câmara de Neubauer foi utilizado 5 µl do pellet após a capacitação, diluído em 95 µl de água em um eppendorf de um e meio mL de onde, após homogeneização, foram retirados 5 µl colocados na câmara de Neubauer coberto com lamínula específica, para contagem de 5 campos em diagonal da parte superior para a parte inferior da câmara que resultava em um número bruto que era utilizado na equação abaixo.

[] X Motilidade = y'

$100 \mu\text{l} \div y' \times 2 = \text{dose } 2,0 \times 10^5$

$100 \mu\text{l} - 70 \mu\text{l} - 10 \mu\text{l} - y' \mu\text{l} = \text{quantidade de meio FERT-TALP a adicionar para que a gota fique com } 100 \mu\text{l};$

Fertilização in vitro – FIV

Os oócitos já maturados no dia anterior passavam por um desnudamento parcial mecânico através de sucessivas aspirações e liberações dos oócitos com uma pipeta de 20 μl até permanecerem apenas poucas camadas de células do *cumulus*. Feito isso eles eram lavados em uma gota de meio TALP de 100 μl e outra com o meio FERT-TALP de 100 μl e colocados em uma placa de Petri de 35mm com 4 gotas contendo 70 μl (15 oócitos/gota) com o meio FERT-TALP, cobertas com quatro mililitros de óleo mineral estéril. Duas gotas receberam uma dose inseminante $2,0 \times 10^5/\text{gota}$ de sêmen sexado, e as outras duas receberam uma dose inseminante com $2,0 \times 10^5/\text{gota}$ de sêmen convencional. O tamanho final da gota de fertilização foi de 100 μl . Espermatozoides e oócitos foram incubados por 18 horas nas mesmas condições já descritas para a maturação.

Cultivo in vitro – CIV

Após a etapa de fertilização os possíveis zigotos foram lavados em três gotas de 70 μl do meio SOF e transferidos para placas com gotas de 100 μl do mesmo meio, cobertas com 4mL de óleo mineral estéril, seguindo para a estufa com 5% de CO₂ para se desenvolverem. No terceiro dia, com 48 horas do início do cultivo foi realizado o primeiro “feeding” (troca de 50% do meio de cultivo – SOF) e a avaliação da taxa de clivagem. No sétimo dia foram observados os percentuais de blastocistos.

Análises do Sêmen

Local das análises

Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária – ANDROLAB, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Recife. Foram feitas três repetições de cada procedimento, uma para cada repetição da produção *in vitro*, todas utilizando as mesmas partidas dos mesmos touros.

CASA

Para a cinética, 5 μl de cada amostra foi colocada em uma lâmina previamente aquecida (37° C), e uma lamínula depositada por cima da gota. A lâmina foi colocada sob o microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Tóquio, Japão) e as imagens foram captadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando o software SCA™ v 5.1 (Microptics, SL, Barcelona, Espanha). Pelo menos cinco campos microscópicos, não consecutivos selecionados aleatoriamente por amostra foram digitalizados, registrando pelo menos 2.000 espermatozoides móveis. As definições de parâmetros padrão foram: linearidade (LIN), retilinearidade (STR), expressos em valores percentuais (%); velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP), expressas em micrometros por segundo ($\mu\text{m/s}$); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) expresso em micrometros (μm); e frequência de batimento flagelar (BCF), expresso em hertz (Hz).

Avaliação da integridade espermática

Integridade acrossômica, integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial foram avaliados por microscopia de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Para a determinação da integridade do acrossoma, os espermatozoides foram corados com isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), segundo Silva *et.al.*, (2012)⁹. Alíquotas (10 μl) de sêmen foram utilizadas para preparação dos estiraços, os quais foram secos a temperatura ambiente. Para corar as células, uma alíquota de 30 μl da solução de FITC-PNA (100 $\mu\text{g/mL}$ em PBS) foi depositada sobre cada lâmina, incubada em câmara úmida a 4 °C por 20 min., lavada em PBS e seca no escuro. No momento da avaliação, 5 μl de meio de montagem (4,5 mL glicerol, 0,5 mL PBS, 5 mg azida sódica e 5 mg p-phenylenediamine) foram depositados sobre a lâmina e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides por lâmina foi examinado, usando filtros LP 515-nm para emissão e 450 – 490 BP nm para excitação, em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha; 1000 X). Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intacto, quando apresentavam a região acrossomal corada em verde fluorescente, ou de acrossoma reagido,

quando apresentavam fluorescência apenas na região equatorial da cabeça ou quando não corados em verde fluorescente.

A integridade da membrana do plasma foi determinada empregando uma combinação de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), tal como descrito por SILVA *et. al.*, (2011)¹⁴. Alíquotas (50 µl) de sêmen foram diluídos em 150 µl de solução Tris contendo 5 µl de CFDA (0,46 mg / mL em DMSO) e 20 µl de PI (0,5 mg / mL em PBS), incubou-se durante 10 min. À 37°C, e fixado com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Usando PAD 485/20 nm de excitação e PAD 580-630 nm filtros de emissão, a 200 células por lâmina foram examinados (400X). Fluorescências verdes e vermelhas foram interpretadas como uma membrana intacta e uma membrana danificada, respectivamente.

Para determinação do potencial da membrana mitocondrial, um método adaptado de (GUTHRIE HD.; WELCH GR., 2006)¹⁵ foi utilizado. Alíquotas (50 µl) de sêmen foram diluídos em 150 µl de Tris contendo 5 µl de fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (0,15 mM em DMSO) e incubados durante 10 min a 37 ° C e fixas com 0,5% de glutaraldeído. Duzentos espermatozoides por lâmina foram examinados (400X), utilizando LP 515 nm e emissão de 450-490 nm BP filtros de excitação. Espermatozoides foram classificados como alto potencial de membrana mitocondrial, ao emitirem fluorescência laranja na peça intermediária e baixo potencial de membrana mitocondrial, quando emitem fluorescência verde.

Análises Estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 16.0 empregando-se a análise de variância (ANOVA). O teste t-Student foi usado para detectar diferenças entre os grupos e o Qui-quadrado utilizado para análise dos resultados da produção *in vitro*. Para todas as análises, os valores foram considerados significativos ($P < 0,05$).

Antes dessas análises, dados percentuais para motilidade progressiva, integridade de acrossoma, a integridade da membrana plasmática e potencial da membrana mitocondrial, linearidade, retilinearidade foram transformados em arcoseno. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

RESULTADOS

Não houve diferença entre touros quando o sêmen era convencional. Com sêmen sexado houve diferença entre touros, com o T2 < T1 e T1=T3 e T2=T3.

Quando se comparou sêmen sexado com o convencional dentro de touros verificou-se que para o T3 houve menor clivagem com sexado, mas sem diferença na produção de blastocistos. Para o T2 não houve diferença na clivagem, mas foi diferente na produção de blastocistos. Para o T1 não houve diferença na clivagem ou em blastocistos.

Tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre diferentes estádios de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado e convencional de três touros da raça 5/8 Girolando. Arcoverde-PE, 2013.

	TIPO	N	CLIVADOS	D7/Clivados	Blastocistos D7/oócitos
T1	Sex.	195	119(61,02%) ^a	54(45,3%) ^{aD}	54(27,69%) ^{aD}
	Conv.	207	141(68,11%) ^a	61(43,2%) ^a	61(29,46%) ^a
	Total	402			
T2	Sex.	145	84(57,93%) ^a	26(30,9%) ^{aD}	26(17,93%) ^{aC}
	Conv.	134	90(67,16%) ^a	41(45,5%) ^b	41(30,59%) ^b
	Total	280		P<0,05	P<0,05
T3	Sex.	133	73(54,88%) ^a	34(46,5%) ^{aC}	34(25,56%) ^{aCD}
	Conv.	145	105(72,41%) ^b	49(46,6%) ^a	49(33,79%) ^a
	Total	278	P<0,01		
Total	Sex.	473	276(58,35%) ^a	114(41,3%) ^a	114(24,10%) ^a
	Conv.	487	336(69,13%) ^b	151(44,9%) ^a	151(31,06%) ^b
	Total	959	P<0,01		P<0,05

^{a, b} Na mesma coluna, médias com letras superecritas diferentes (P<0,05).

^{CD} Na mesma coluna médias com letras superecritas diferentes (P<0,05).

O resultado estatístico mostrou diferenças significativas (P< 0,05) nas análises do CASA entre os touros, tanto em comparações feitas entre as amostras de sêmen sexado quanto nas amostras de sêmen convencional, em diversas variáveis principalmente as que se referem ao padrão de movimento dos espermatozoides VCL (Velocidade curvilínea); VSL (Velocidade linear); VAP (Velocidade de trajeto). No sêmen convencional os valores médios de VCL, VSL e VAP obtidos pelo T1 foram 66,5±0,8 µm/s; 36,9±0,3 µm/s e 46,4±0,5 µm/s, respectivamente, e pelo T2 foram 46,2 ±2,5 µm/s; 27,6 ±2,3 µm/s e

33,8±2,4 µm/s, respectivamente (P<0,05). Os valores obtidos pelo T3 foram 64,6±5,1 µm/s; 35,3±0,6 µm/s e 44,2±1,0 µm/s, respectivamente, diferiram do T2 (P<0,05) como pode ser observado na tabela 2.

Os estudos realizados entre as amostras de sêmen sexado mostraram diferenças entre os touros nas variáveis VCL, VSL e VAP onde o T1(117,7±1,6 µm/s; 60,0±0,3 µm/s; 73,6±0,4 µm/s, respectivamente) quando comparado aos touros T2 (80,2±2,3 µm/s; 47,0±2,0 µm/s; 57,7±0,9 µm/s, respectivamente) e T3 (86,4±5,7 µm/s; 46,2±2,7 µm/s; 53,8±2,8 µm/s, respectivamente) obteve valores mais elevados. Já as variáveis LIN (Linearidade) e ALH (Deslocamento lateral da cabeça) não se observou diferença estatística. O resultado da BCF (Frequência de batimento de cauda) foi significativo entre os touros de modo que o T1 apresentou 14,5±0,3 Hz > T3(13,0±0,4 Hz) > T2(10,5±0,3 Hz). Essas diferenças foram vistas também através dos valores de P=0,04; P=0,009, respectivamente.

Tabela 2: Análise comparativa do sêmen convencional, sexado e convencional x sexado de três touros 5/8 Girolando quanto às variáveis da cinética espermática.

	N	T1		T2		T3	
		Convenc.	Sexado	Convenc.	Sexado	Convenc.	Sexado
VCL	3	66,5±0,8 ^a	117,7±1,6 ^C	46,2±2,5 ^b	80,2±2,3 ^D	64,6±5,1 ^a	86,4±5,7 ^D
VSL	3	36,9±0,3 ^a	60,0±0,3 ^C	27,6±2,3 ^b	47,0±2,0 ^D	35,3±0,6 ^a	46,2±2,7 ^D
VAP	3	46,4±0,5 ^a	73,6±0,4 ^C	33,8±2,4 ^b	57,7±0,9 ^D	44,2±1,0 ^a	53,8±2,8 ^D
LIN	3	55,4±1,0 ^a	55,7±0,7 ^C	59,6±2,4 ^a	58,7±2,4 ^C	55,1±3,1 ^a	53,6±2,6 ^C
STR	3	79,4±1,5 ^a	81,6±0 ^C	81,4±1,0 ^a	81,4±2,2 ^C	79,7±0,3 ^a	85,7±0,5 ^C
ALH	3	2,7±0,0 ^a	3,2±0,2 ^C	2±0,0 ^a	2,4±0,1 ^C	2,6±0,4 ^a	3,2±0,3 ^C
BCF	3	10,1±0,2 ^a	14,5±0,3 ^C	9,3±0,4 ^a	10,5±0,3 ^D	9,9±0,2 ^a	13,0±0,4 ^E

VCL (Velocidade curvilínea, µm/s); VSL (Velocidade linear, µm/s); VAP (Velocidade de trajeto, µm/s); LIN (Linearidade,%); STR (Retilinearidade, %); ALH (Deslocamento lateral da cabeça, µm); BCF (Frequência de batimento de cauda, Hz). ^{a, b} Na mesma linha, médias com letras superescritas diferentes (P<0,05). ^{C,D,E} Na mesma linha, médias com letras superescritas diferentes (P<0,05).

Ao se comparar os resultados para as análises com sondas fluorescentes, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial mitocondrial não foram observadas diferenças entre os grupos de sêmen convencional. Já para o sêmen sexado a integridade de membrana foi a única variável que diferiu estatisticamente entre os touros (Tabela 3), em que o T1 (38 ±2,7) diferiu do T3(53,8± 1,8) (P=0,009), e não divergiu do T2 (44,1±4,4).

Tabela 3: Médias e erros-padrão da preservação de estruturas dos espermatozoides do sêmen convencional e sexado de três touros 5/8 Girolando.

	Sondas Fluorescentes					
	T1		T2		T3	
	Convenc.	Sexado	Convenc.	Sexado	Convenc.	Sexado
Membrana	47,5±11,8 ^a	38,0±2,7 ^C	40,1±7,3 ^a	44,1±4,4 ^{CD}	66,5±2,7 ^a	53,8±1,8 ^D
Mitocondria	66±19,0 ^a	79,6±4,8 ^C	73,6±3,6 ^a	81,0±3,2 ^C	82,6±7,9 ^a	85,5±2,7 ^C
Acrossoma	71,8±4,0 ^a	56,0±12,8 ^C	74,2±3,0 ^a	55,8±10,5 ^C	76,6±0,4 ^a	69,3±1,1 ^C

^{a, b} Na mesma linha, médias com letras superescritas diferentes (P<0,05).

^{C, D, E} Na mesma linha, médias com letras superescritas diferentes (P<0,05).

DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram que a diferença entre semen sexado e convencional é inerente ao touro, e também que não existiu diferença entre touros para o sêmen convencional, isto é, os touros têm a mesma capacidade de produzir blastocistos com semen convencional, no entanto quando se utilizou o sêmen sexado, as diferenças apareceram, provavelmente porque o sêmen de alguns touros podem ser mais sensíveis a citometria de fluxo do que outros, tendo em vista que o sêmen sexado do T2 (17,93%) apresentou resultados inferiores ao T1(27,69%) para produção de blastocisto.

Os resultados apresentados, semelhantes a outros trabalhos⁶ que observaram o efeito do sêmen de 5 touros sobre a fertilização *in vitro* de oócitos provenientes de abatedouros, e obtiveram diferenças significativas entre touros da mesma raça, e em lotes do mesmo touro, tanto na taxa de fertilização quanto na taxa de sobrevivência embrionária, confirmando que o fator touro se reveste de importância determinante quanto à capacidade de fertilização, bem como quanto à capacidade de crescimento dos embriões clivados até mórula e seu posterior desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Como pode ser observado na Tabela 1 o sêmen não sexado do touro 1 apresentou na média geral valores maiores que os touros 2 e 3 quanto aos parâmetros da cinética espermática. É possível que estas características seminais (VCL, VSL, VAP, ALH e BCF) tenham contribuído para seu melhor desempenho na produção de embriões *in vitro*. Os parâmetros da cinética espermática têm sido positivamente correlacionados com fertilidade¹⁶, dentre estes parâmetros o VCL, VSL e ALT já foram correlacionados à hiperatividade espermática que

é considerado um padrão de motilidade observado em espermatozoides que estejam no processo de capacitação¹⁷ e a utilização do sêmen já em processo de capacitação pode ter favorecido a fertilização *in vitro*.

Ao se analisar as amostras do sêmen sexado o T1 obteve os melhores resultados para produção de blastocistos, diferindo do T2. No entanto nas análises do CASA essas diferenças foram expressas de forma mais definida distinguindo-o positivamente dos demais touros em variáveis como VCL, VSL, VAP, onde é possível observar claramente que o T1 foi superior aos demais e o T3 superior ao T2, o que transfere exatamente o resultado da produção *in vitro* fortalecendo as afirmações outrora relada por outros pesquisadores sobre o importância da qualidade do sêmen e de sua influência na fertilidade^{3,5}.

A porcentagem de espermatozoides móveis mostra uma correlação significativa com a probabilidade de alcançar a prenhez. O VCL, VAP, STR, BCF também mostraram valores significativos para fertilidade na espécie humana¹⁰.

Em um estudo realizado com sêmen sexado criopreservado, o mesmo apresentou valores baixos para motilidade¹⁸ o que não foi observado no presente estudo já que os valores da cinética (VCL, VSL e VAP) do sêmen sexado foram superiores aos do sêmen convencional. No entanto os mesmos autores citam que entre as características físicas afetadas pela sexagem está a integridade de membrana que são, provavelmente, devido ao estresse mecânico, nesse sentido a redução da pressão durante o processo de sexagem aumentou a sobrevivência do espermatozoide sexado e conseqüentemente as taxas de fertilização. Um fato semelhante a outro estudo que observaram que apesar do sêmen sexado exigir menor quantidade de meio de capacitação (heparina) resultou em uma produção de blastocistos inferior quando comparado ao convencional⁷, esses dados corroboram os resultados obtidos no presente trabalho em que os valores de VCL, VSL e VAP do T1 (117,7±1,6 µm/s; 60,0±0,3 µm/s; 73,6±0,4 µm/s, respectivamente) T2 (80,2±2,3 µm/s; 47,0±2,0 µm/s; 57,7±0,9 µm/s, respectivamente) e T3 (86,4±5,7 µm/s; 46,2±2,7 µm/s; 53,8±2,8 µm/s, respectivamente) foram maiores que os valores das mesmas variáveis com o sêmen convencional, mas isso não foi refletido na produção *in vitro*.

Índices de fertilidade têm sido correlacionados com os padrões de movimento espermático, tendo em vista diferenças significativas observadas no padrão de movimento exercido por espermatozoides que atingem altas e baixas taxas de fertilização¹⁹.

O presente estudo divergiu de outros trabalhos que correlacionaram a linearidade espermática com o maior índice de fertilidade²⁰.

A variável frequência de batimento de cauda (BCF) diferiu significativamente entre os touros e demonstrou maior correlação quando comparado com os valores de VCL utilizando sêmen sexado ($r = 0,80$) do que quando foi correlacionado ao sêmen convencional ($r = 0,69$), sabendo que o deslocamento lateral de cabeça já foi correlacionado com a fertilização, por indicar vigor de batimento flagelar junto com a frequência de rotação da célula, que são provavelmente importantes para a progressão de espermatozoides²¹. Os dados obtidos no presente estudo podem ser justificados também através dos resultados observados em outro experimento, que perceberam que os espermatozoides sexados demonstraram a maioria dos parâmetros de motilidade superiores aos submetidos à técnica convencional, e afirmou existir fortes indícios que espermatozoides bovinos que passam pela técnica de citometria de fluxo entram em estado de hiperativação²².

A avaliação espermática com o auxílio das sondas fluorescentes demonstrou que o T1 sêmen sexado apresentou maior porcentagem de lesão de membrana plasmática em comparação com o T2 e T3, respectivamente ($38 \pm 2,7$; $44,1 \pm 4,4$; $53,8 \pm 1,8$), demonstrando importância estatística em relação ao T3 ($P < 0,05$), o que contradiz seus resultados da produção embrionária. No entanto partindo do princípio da importância da integridade de membrana para obter bom resultado fertilizante⁵. Provavelmente por se tratar de produção *in vitro* onde não existem barreiras naturais a serem transpassadas, esse percentual de lesão da membrana, com essa intensidade somado às outras características com valores superiores aos demais, possivelmente não influenciou no seu desempenho.

CONCLUSÃO

No presente trabalho o sêmen sexado foi menos eficiente na produção de blastocisto quando comparado ao sêmen convencional. As análises do CASA bem como as

sondas fluorescentes foram compatíveis com o potencial fertilizante das amostras de sêmen sexado e convencional em touros da raça 5/8 Girolando.

REFERÊNCIAS

1. Alexandre A, Marinho, C, Vitor Abreu, V, Barros, KM. Boletim Setorial do Agronegócio, Bovinocultura Leiteira [Internet] Recife: Sebrae; 2010 May [cited 2013 Oct 6]. Available from: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/16730575/boletim-setorial-do-agronegocio-bovinocultura-leiteira>
2. Varago, F. C., Mendonça, L. F., Lagares, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2008 Set 05; 32 (2): 100-109.
3. Seidel JR GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. Theriogenology, 2003; 59: 585-598.
4. Rupert P. Amann and David F. Katz. Reflections on CASA After 25 Years. Journal of Andrology, 2004 May/June; 25(3): 317-325.
5. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology. 2005; 64: 492-504.
6. Marques,C.C.; Baptista, M.C.; Pereira, R.M.; Vasques, M.I.; Lopes da L.F. C.; Horta A.E.M. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fertilização *in vitro* e desenvolvimento de embriões em co-cultura. Revista Portuguesa de Zootecnia. 1995 out 30; 2(2): 103-110.
7. 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. 2009; 71: 30-38.
8. Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Tanghe, S.; Coryn, M.; Maes, D.; DE Kruif, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. Theriogenology. 2005; 64: 706-719.
9. Silva, E.C.B.; Cajueiro, J.F.P.; Silva, S.V. ; Soares, P.C.; Guerra, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology. 2012; 77: 1722-1726.
10. Larsen, L.; Scheike, T.; Jersen, T. K.; Bonde, J. P.; Ernst, E.; Hjollund, N. H.; Zhou, Y.; Skakkebaek, N. E.; Giwercman, A.. Computer- assisted sêmen analysis parameters for fertility of men from the general population. Human Reproduction. 2000; 15(7): 1562-1567.
11. Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C.; Alonso, M.A.; Carvalho, H.F.; Oliveira, L.Z.; Nascimento, J.; Silva, D.F.; Affonso, F.J.; Lemes, K.M.; Jaimes, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2011 abr./jun; 35(2): 145-151.

12. Samplaski, M. K.; Agarwal, A.; Sharma, R.; Glickman, E. S. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. *International Journal of Urology*. 2010; 17: 839–847.
13. Arruda, R.L.; Orro, I.R.; Passos, T.S.; Costa e Silva, E.V.; Zúccari, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2010; 34: 168-184.
14. Silva, S.V.; Soares, A.T.; Batista, A.M.; Almeida, F.C.; Nunes, J.F.; Peixoto, C.A.; Guerra, M.M.P. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in Tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod. Domest. Anim.* 2011 Oct; 46(5): 874-81.
15. Guthrie H.D.; Welch, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal Animal Science*, 2006 Aug; 84(8): 2089-100.
16. Lavara, R.; Mocé, E.; Lavara, F.; Castro, M.P.V.; Vicente, J.S. Do parameters of seminal quality correlate with the result of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*. 2005; 64: 1130-1141.
17. Farrel, P.B.; Presicce, G.A.; Brockett, C.C.; Foot, R. H. Quantification of bull sperm characteristics by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 1998; 49: 871-879.
18. Carvalho, J.O; Sartori, R.; Machado, G.M.; Mourão, G.B.; Dode, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 2010; 74: 1521–1530.
19. Verstegen, J.; Iguer-ouada, M.; Oclin, k. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57: 149-179.
20. Zhang, B.R., Larsson, B.; Lundeheim, N.; Håård, M.G.; Rodriguez-Martinez H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed sêmen from young dairy bulls entering an IA-programe. *International Journal of Andrology*. 1999; 22(4): 253-260.
21. Jeulin, C.; Lewin, L.M.; Chevrier, C.; Schoevaert, Brossault, D. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1996; 3(5): 147- 161.
22. Gallego, A.M. Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides bovinos sexados por citometria de fluxo [Dissertação]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2010. 118 p. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-01042011-143106/pt-br.php>



6- APÊNDICES /APÊNDICE A -



MATURAÇÃO

Placas Maturação → 5 gotas por placa → Marca com 30 μ l do meio de maturação, cobre com óleo mineral (+ ou – 4,5 mL) e completa pra 90 μ l (60 μ l) → Levar na estufa de CO₂ para equilibrar por no mínimo 2h.

24 horas na MATURAÇÃO



APÊNDICE B –

FERTILIZAÇÃO



Placa de lavagem → 2 gota de 100 µl de TL Semen e 1 gota de 100 µl de FIV gotas/grupo.

Placas de FIV →

Sêmen Convencional e Sêmen Sexado → marcar com 70 µl de meio de FIV, coloca-se 4,5 mL de óleo mineral e completa com valor Y µl de sêmen + meio FIV (o que faltar para completar 100µl).

- Estabilizar todas as placas/meios na estufa de CO₂ por no mínimo 2h.

Retirar parcialmente as células do cummulus dos oócitos maturados → lava em 1 gota de 70 µl de TL Semen e 1 gota de 70 µl de FIV gotas → coloca na placa de FIV.

18 horas na FECUNDAÇÃO



APÊNDICE C –

CULTIVO



Placa de lavagem → Três gotas de meio SOF/grupo. Colocar na estufa para equilibrar o meio por no mínimo 2h

Placas de cultivo → marca com 30 μ l de meio SOF, coloca-se 4,5 ml de óleo mineral e completa para 100 μ l a gota de cultivo. Colocar na estufa para equilibrar o meio por no mínimo 2h.

Retira-se “os oócitos” das gotas de FIV e lava-se cada “grupo” em 3 gotas de 70 μ l de SOF e põe na placa de cultivo.

Feeding → A cada 48 hs, onde retira-se 50 μ l do meio antigo e adiciona-se 50 μ l de meio novo.



APÊNDICE D –
Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós-Graduação em Sanidade e
 Reprodução de Ruminantes- Experimento- Pábola



Ficha controle N^o _____

CONTROLE DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES – ABATEDOURO

Considerações Iniciais

GRUPOS	N ^o Oócitos	Sêmen utilizado	VOL. inicial (UL)	CONC. []	MOTIL. ESP. (%)	VOL. final	VOL. adicionar	OBSERVAÇÕES

MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Data da MIV: _____, _____ de _____ de 20 ____ Horário da MIV: ____ : ____

Data da FIV: _____, _____ de _____ de 20 ____ Horário da FIV: ____ : ____

GRUPOS	N ^o Oócitos	Clivados	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Blastocisto eclodido	Total de embriões	Eclusão

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Data da CIV: _____, _____ de _____ de 20 ____ Horário da CIV: ____ : ____

1^o Feeding – Avaliação da Clivagem

2^o Feeding

Avaliação final dos Embriões

Data ____/____/____ Data ____/____/____ Data ____/____/____

Obs: _____ Obs: _____ Assinatura _____

2 ANEXOS

CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA

DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português ou inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. *Ciência Animal Brasileira* sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde o trabalho foi realizado. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional),

References

Artigos do tipo **Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

As referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos são, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Por essa razão, solicitamos que esse tipo de fonte **não** seja utilizada como referência.

Com relação às teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos **últimos três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente, **apresentar o link** que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato .pdf.

Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos e não de livros-texto.

O editor científico pode solicitar mais informações em relação às referências no momento de editoração do artigo. Seu pronto atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referenciação bibliográfica, técnica ou eletrônica.

Exemplos de referências

Trabalho em Periódicos:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7282/#A32362>)

Kalavathy R, Abdullah, N, Jalaludin, S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. British Poultry Science. 2003;44(1):139-144.

Trabalho em Periódicos Online:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7281/#A55587>)

Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte, TS, Franco KL. Utilização do adesivo Metil-2-Cianoacrilato e fio de náilon na reparação de feridas cutâneas de cães e gatos [Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats]. Ciência Rural [Internet]. 2001 Apr [cited 2008 Oct 10];31(2):285-289. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000200015. Portuguese.

Livro Inteiro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34171>)

Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1st ed. Olinda: Luci Artes Gráficas; 2003. 651p. Portuguese.

Capítulo de Livro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34915>)

Pascoe PJ. Cuidados pós-operatórios do paciente. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2nd ed. São Paulo: Manole; 1998. p. 287-299. Portuguese.

Legislação:

Os modelos aqui foram adaptados porque a normalização proposta no Estilo Vancouver não corresponde à realidade brasileira.

Brasil. Constituição 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado; 1988. Portuguese.

Brasil. Ministério da Educação e Ministério da Saúde. Portaria interministerial no. 1000 de 15 de abril de 2004. Resolvem certificar como Hospital de Ensino das Instituições Hospitalares que servirem de campo para a prática de atividades curriculares na área da saúde, sejam Hospitais Gerais e, ou Especializados. Diário Oficial da União. 2004 Abr 16; Seção 1. Portuguese.

Programas de Computador:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7244/>)

SAS Institute. Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]. Version 8. Cary (NC): SAS Institute Inc., 2002.

Websites:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/#A59404>)

Silva MET, Flemming S, Martinez JL, Thomazini PL. Rendimento de carcaça de búfalos (*bubalus bubalis* L.) confinados em terminação, com dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. 2 - Características Quantitativas [Internet]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia; 2010 Oct 8 [cited 2013 Jun 27]. Available from: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/reproducao-melhoramento-anim/23861-Rendimento-carcaa-bfalos-bubalus-bubalis-confinados-terminao-com-dietas-contendo-diferentes-relaes-volumoso-concentrado---Caractersticas-Quantitativas.html>. Portuguese.

Solicita-se que o número DOI, ou o link correspondente, dos artigos assim identificados seja acrescentado ao final da referência.

Ribeiro Carina Teixeira, De Souza Diogo Benchimol, Medeiros Jr. Jorge Luiz, Costa Waldemar Silva, Pereira-Sampaio Marco Aurélio, Sampaio Francisco José Barcellos. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. Acta Cir. Bras. [periódico na Internet]. 2013 Jun [citado 2013 Jun 27]; 28(6): 419-422. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000600003>.

Exemplo de citação

Reports of *L. similis* lesion are scarce in the literature. Histopathological studies with three *Loxosceles* species of clinical importance, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa*, showed that the venom induces vasodilation, edema, inflammatory infiltrate (mainly neutrophilic), hemorrhage, cutaneous muscle necrosis, thrombosis and arteriolar walls degeneration^{6, 13-15}. It is necessary to elucidate whether the histological lesion induced by the *Loxosceles similis* venom is similar to that observed in other species of medical importance. Furthermore, it is important to determine the pathogenesis of the loxoscelic dermonecrotic lesion(...)

According to Zanetti et al. (17) and Nowatzki et al. (18) who studied the action of the *L. intermedia* venom in vitro on endothelial cells, it was observed that 18 hours after the venom action, cells showed plasmatic membrane convolutions and chromatin condensation.

6. Futrell J. Loxoscelism. Am J Med Sci. 1992;304(4):261-7.

13. Smith WC, Micks WD. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider (*Loxosceles reclusa*). Lab Invest. 1970;22:90-3.

14. Strain GM, Snider TG, Tedford BL, Cohn GH. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. Toxicol. 1991;29(8):989-96.

15. Ospedal KZ, Appel MH, Neto JF, Mangili OC, Sanches Veiga S, Gremski W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. Int J Exp Pathol. 2002;83(6):287-94.

17. Zanetti VC, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Mangili OC, Veiga SS, et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. Blood Coagul Fibrinolysis. 2002;13(2):135-48.

18. Nowatzki J, de Sene RV, Paludo KS, Veiga SS, Oliver C, Jamur MC, et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. Toxicol. 2010;56(4):535-43

(Fonte: Pereira NB, Kalapothakis E, Vasconcelos AC, Chatzaki M, Campos LP, Vieira FO et al. Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis [periódico na Internet]. 2012 [citado 2013 Nov 04]; 18(3): 277-286. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992012000300005&lng=pt. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300005>)

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor.
8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho. Caso a pesquisa tenha envolvido questionário aplicado a pessoas, será necessário a aprovação pelo Comitê de Ética Humano da instituição, também.

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a [Licença Creative Commons Attribution](#) que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.
- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja [O Efeito do Acesso Livre](#)).

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.