



Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos

Use of Mini Percoll modified for selection and reduction of the formation of reactive oxygen species (ROS) on bull sperm

N.P. Folchini, F.G. Leivas, F.W. Santos, E.B. Schwengber, D.M. Martin, C.C. Spiazzi, D.S. Brum¹

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil.

¹Correspondência: danisbrum@unipampa.edu.br

Resumo

Objetivou-se modificar o método de mini-Percoll para seleção espermática e redução da formação de ROS em espermatozoides bovinos. Dez palhetas de sêmen de um touro *Bos taurus* foram descongeladas, avaliadas, divididas em duas frações e depositadas sob gradientes de Percoll 90 e 45% (controle) e Percoll 90, 60 e 30% (tratado), sendo centrifugados por cinco minutos a 9000 x G. Após lavagem, foram efetuadas a avaliação morfofuncional e a quantificação de ROS. A proporção de espermatozoides com defeitos no grupo-controle (13,5%) foi igual ($P > 0,05$) ao do tratado (12,5%). A recuperação de 65,5 e 67 x 10⁶ espermatozoides/mL, a motilidade progressiva de 54 e 63% e a integridade de membrana 23,7 e 22% não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos controle e tratado, respectivamente. Foi observada menor ($P < 0,05$) formação de ROS no grupo-tratado (3,03 ± 1,43 UF), comparado ao grupo-controle (7,24 ± 1,38 UF). A seleção espermática por gradientes de 90, 60 e 30% não afetou a recuperação e a qualidade dos espermatozoides, mas apresentou menor produção de ROS. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o uso desses gradientes é eficiente na separação espermática, os quais podem ser utilizados em programas de PIV de embriões bovinos.

Palavras-chave: bovino, FIV, Percoll, ROS, sêmen.

Abstract

*The objective was to modify the method for mini Percoll sperm selection and reducing the formation of ROS in bovine spermatozoa. Ten straws of semen from a bull *Bos taurus* were thawed, evaluated, divided into two fractions and deposited in Percoll gradients of 90 and 45% (Control) and Percoll 90, 60 and 30% (Treated), and centrifuged for 5' to 9000 xG. After washing was performed morphofunctional evaluation and quantification of ROS. Was similar ($P > 0.05$) the proportion of sperm with defects in the Control group (13.5%) and Treated (12.5%). The recovery of 65.5 and 67 x10⁶ spermatozoa/mL, progressive motility of 54 and 63% and membrane integrity of 23.7 and 22% did not differ ($P > 0.05$) between the Control and Treated group, respectively. A lower formation of ROS ($P < 0.05$) was observed in the Treated group (3.03 ± 1.43 FU) compared to Control group (7.24 ± 1.38 FU). The sperm selection by Percoll gradients of 90, 60 and 30% did not affect the recovery and quality of sperm but showed a lower production of ROS. Based on these results we can conclude that the use these gradients is effective to separate sperm, can be used in programs of bovine IVP.*

Keywords: bovine, IVF, Percoll, ROS, semen.

Introdução

A fecundação *in vitro* (FIV) é uma etapa complexa no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV), em que os espermatozoides necessitam iniciar o processo de capacitação para tornarem-se aptos a realizar a fecundação de ovócitos previamente maturados. Para o sucesso da FIV, é essencial a prévia seleção espermática, cujo objetivo é recuperar o maior número de espermatozoides intactos possíveis, não lhes causar danos estruturais, alteração de motilidade e vigor, além de eliminar substâncias indesejáveis (Henkel e Schill, 2003), como descapacitantes e o excesso ROS. Inúmeras técnicas já foram desenvolvidas com essas finalidades, em que se destacam *swim-up*, lavagem por centrifugação, filtração em coluna de lã de vidro ou sefadex e gradiente descontínuo de densidades de Percoll (Coelho et al., 2000; Dode et al., 2002).

A técnica de gradientes de Percoll é, sem dúvida, a mais utilizada nos laboratórios de PIV. A eleição dessa técnica deve-se à eficácia de separação e às taxas de recuperação de células que o Percoll proporciona, o que o torna superior às demais (Bollendorf et al., 1994; Cesari et al., 2006; Borges et al., 2007; Carvalho et al., 2008). Trabalhos realizados na década de 90 preconizavam volumes de 2 mL por gradiente, em que, após a deposição do sêmen, realizava-se uma centrifugação a 400 x G, por um período de até 30 min. O número de gradientes utilizados era bastante variado, sendo propostos protocolos com até sete gradientes de densidade, com o objetivo de produzir um desvio de sexo nos embriões produzidos. No entanto, na busca de uma máxima



recuperação de espermatozoides provenientes de diferentes touros ou de sêmen processado por métodos distintos, como o sêmen sexado e, mais recentemente, o sêmen reverso, o método de seleção por gradientes de Percoll sofreu diversas modificações ao longo dos anos. Os protocolos tradicionais foram substituídos pelos métodos de mini-Percoll que empregam gradientes de 90 e 45% em volumes reduzidos e altas forças de centrifugação. O mini-Percoll inicialmente utilizado em reprodução humana (Ord et al., 1990) e posteriormente proposto para a separação de sêmen sexado em bovinos, está sendo empregado com sucesso na FIV tanto para sêmen sexado como para convencional (Leivas et al., 2006; Machado et al., 2009). Apesar da praticidade e da alta rentabilidade produzida por esses métodos de Percoll modificados, a maioria das mudanças tem sido conduzida sem a avaliação de possíveis danos aos espermatozoides.

Sabe-se que, quando se processam essas técnicas de seleção espermática, o sêmen é submetido a fatores de risco, como altas forças de centrifugação e exposição ao Percoll, além de sofrer a ação de ROS (Bilodeau et al., 2000), que são subprodutos do metabolismo aeróbio que se formam de forma fisiológica. Apesar de serem benéficas em certos níveis, as ROS, quando em excesso, influenciam negativamente as células, causando lipoperoxidação de membrana, dano ao DNA e às proteínas (Bilodeau et al., 2001; Champe et al., 2009). Apesar de existirem estudos mostrando a influência da centrifugação, do tempo de exposição e do volume do gradiente de Percoll sobre a motilidade espermática (Akerlof et al., 1987; Thange et al., 2002) e a integridade de membrana dos espermatozoides (Way et al., 1995; Tanghe et al., 2002; Machado et al., 2009), são inexistentes estudos que relatem a influência desses fatores sobre a produção de ROS em espermatozoides bovinos. Experimentos conduzidos com espermatozoides suínos apresentaram menores taxas de produção de ROS para gradientes 90 e 45%, quando comparado a outras associações de dois gradientes de densidade (Matás et al., 2011). Em humanos, protocolos utilizando três gradientes de densidade evidenciaram diferenças significativas na produção de ROS em espermatozoides coletados de diferentes frações do gradiente, demonstrando a capacidade de camadas intermediárias reterem uma grande concentração de espermatozoides imaturos, células estas que são os principais responsáveis pela produção de ROS (Ollero et al., 2001).

Apesar das inúmeras técnicas propostas para avaliação espermática, um número restrito de testes é comumente aplicado em rotinas de FIV em bovinos. A utilização de outros parâmetros, como a produção de ROS, pode ser uma excelente ferramenta para testar novos protocolos de seleção espermática. Com base nesses fatores apresentados, associados à crescente demanda da PIV como ferramenta para acelerar o ganho genético bovino, e na alta variação de resultados obtidos até o momento, no que se refere à recuperação espermática e aos consequentes taxas de FIV e desenvolvimento embrionário, este trabalho teve como objetivo avaliar a modificação do método de mini-Percoll para seleção espermática e sua influência na formação de ROS em espermatozoides bovinos.

Material e Métodos

Dez palhetas contendo amostras (0,25 mL) de sêmen de um touro *Bos taurus* com fertilidade conhecida foram utilizadas neste trabalho. Cada palheta foi submetida a dois métodos de separação espermática, os quais usaram diferentes gradientes de Percoll.

Cada palheta foi descongelada a 35°C por 20 s em banho-maria. O conteúdo foi acondicionado em tubos de microcentrífuga (0,5 mL), sendo retirada uma amostra para avaliação espermática antes do processamento (pré-Percoll). Amostras de sêmen (80 µL) foram utilizadas para a preparação dos gradientes de Percoll e foram depositadas sobre os gradientes de concentração do grupo-controle (90 e 45%) e do grupo-tratado (90, 60 e 30%).

Os gradientes 90, 60, 45 e 30% foram previamente preparados a partir de Percoll comercial (Sigma, P-1644, St Louis, MO, USA) diluído em meio Fert-TALP (Parrish et al., 1986). Para o grupo-controle, utilizou-se volume de 450 µL de gradientes de 90 e 45%, e para o grupo-tratado, foram utilizados volumes de 300 µL de gradientes de 90, 60 e 30%. Os gradientes de ambos os grupos foram montados em tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados por 5 min a 9000 x G em centrífuga de microtubos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo a seguir retirado o *pellet* resultante (100 µL) de cada microtubo e ressuspenso individualmente em meio Fert-TALP (300 µL). Os microtubos foram submetidos a uma nova centrifugação por 1 min a 9000 x G. O *pellet* de 100 µL resultante da segunda centrifugação foi homogeneizado e utilizado para a avaliação espermática pós-Percoll.

Os critérios empregados na avaliação da viabilidade espermática foram motilidade, vigor, concentração, morfologia, integridade de membrana e formação de ROS. A motilidade e o vigor foram avaliados em microscopia de campo claro com aumento de 400x, sendo a motilidade expressa em porcentagem (0-100) e o vigor por um escore que variou de 0 a 5, conforme normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual..., 1998). A concentração foi realizada por meio da contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer, utilizando-se uma diluição de 1:20, sendo o resultado obtido em milhões de espermatozoides/mL. As alterações morfológicas dos espermatozoides foram quantificadas por meio de preparação úmida em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000x, em que 200 células de cada tratamento foram contadas e seus defeitos classificados em maiores e menores, conforme Barth e Oko (1989). A integridade de membrana



foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) modificado por Lomeo e Giambierso (1991), em que amostras de sêmen (40 μ L) foram diluídas em água destilada (80 μ L; diluição 1:2), resultando em uma suspensão com 100 mOsm. As amostras foram incubadas por 8 min a 37°C, sendo a seguir contadas 100 células por tratamento, utilizando-se microscópio de contraste de fase, com aumento de 400X. Foram considerados íntegros os espermatozoides que reagiram enrolando a cauda, e com lesão os espermatozoides que não reagiram, mantendo a cauda sem alteração. As concentrações de ROS no sêmen foram determinadas por um método espectrofluorimétrico (Gadea et al., 2005), usando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D) e análise em espectrofluorímetro (Shimadzu, Tokio, Japão). As amostras foram incubadas em DCF-D (10 μ L; 1 mM) no escuro. A oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi medida para a detecção das ROS. A emissão da intensidade de fluorescência da DCF foi realizada em 520 nm (com excitação de 480 nm), 30 min após a adição da DCF-D ao meio, sendo a produção de ROS nos espermatozoides expressa em unidades de fluorescência (UF) conforme a intensidade de fluorescência emitida.

Os dados da morfologia espermática foram analisados pelo teste qui-quadrado (X^2), sendo que, para as demais características morfofuncionais, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram avaliados pelo procedimento proc ANOVA do SAS, 1998, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. A formação de ROS foi avaliada por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

Resultados e Discussão

O sucesso da fecundação *in vitro* e posterior desenvolvimento embrionário estão diretamente relacionados com a qualidade do sêmen e o método de seleção espermática utilizado (Walters, 2004). A técnica de seleção escolhida, para ser eficiente, deve proporcionar alta recuperação de espermatozoides, sem causar-lhes danos estruturais/fisiológicos, como também eliminar substâncias prejudiciais (Henkel e Schill, 2003) como ROS. Neste trabalho, a recuperação espermática foi similar ($P > 0,05$) para os grupos controle e tratado (Tab. 1), sendo a recuperação média após o uso do método de Percoll de $132,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, representando mais de 50% do número de espermatozoides totais antes da centrifugação com Percoll (239×10^6 espermatozoides/mL). Estes resultados corroboram diversos estudos que comprovaram a superioridade do método de gradientes de Percoll, sendo sua capacidade de recuperação um dos seus principais atributos, quando comparado a outras técnicas de seleção espermática (Bollendorf et al., 1994; Cesari et al., 2006; Borges et al., 2007; Carvalho et al., 2008).

Na avaliação morfológica, o número total de patologias e a proporção de espermatozoides com defeitos maiores e menores foram similares ($P > 0,05$) para os dois grupos (Tab. 1). Embora a porcentagem de patologias do sêmen utilizado neste experimento estivesse dentro dos padrões aceitáveis pelo CBRA (Manual..., 1998), os métodos de separação mostraram-se eficientes na redução das alterações morfológicas nos espermatozoides selecionados, sendo significativamente menor ($P > 0,05$) o número de espermatozoides com patologias pós-Percoll, quando comparado ao sêmen antes do processamento (Tab. 1), sendo estes resultados semelhantes aos obtidos em diferentes trabalhos que mostram um aumento na seleção de espermatozoides com morfologia normal após seleção por gradientes de Percoll (Cesari et al., 2006; Machado et al., 2009).

Tabela 1. Características morfofuncionais de espermatozoides bovinos ao descongelamento (pré-Percoll) e pós-seleção por Percoll (controle e tratado).

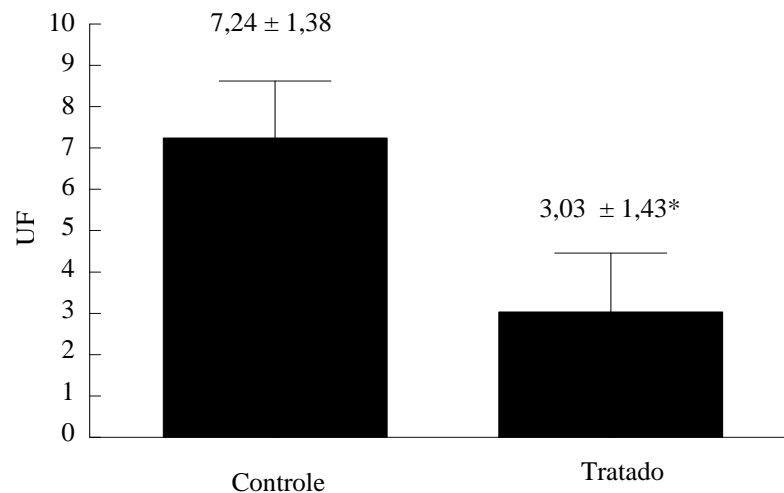
	Concentração (x 10 ⁶)	Motilidade %	Vigor	Membrana íntegra %	Morfologia espermática		
					Totais %	Maiores %	Menores %
Pré-Percoll	239,0 ^a	79,0 ^a	3,8	46,3 ^a	24,0 ^a	15,0 ^a	9,0
Controle	65,5 ^b	54,0 ^b	3,3	23,7 ^b	13,5 ^b	5,0 ^b	8,5
Tratado	67,0 ^b	62,0 ^b	4,0	22,0 ^b	12,5 ^b	5,50 ^b	7,0

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

A motilidade e o vigor espermático pós-Percoll foram semelhantes ($P > 0,05$) para os grupos controle e tratado. No entanto, o aumento observado no percentual de espermatozoides com morfologia normal, após o procedimento de seleção espermática, não foi constatado na motilidade pós-Percoll, sendo inferior ($P < 0,05$) ao encontrado nas amostras no pré-Percoll, embora o vigor tenha se mantido igual (Tab. 1). Estes dados diferem dos encontrados na literatura, os quais descrevem maior motilidade espermática pós-Percoll (Akerlof et al., 1987; Thange et al., 2002). Sabe-se que a motilidade é uma condição essencial para que ocorra a fecundação, no entanto, antes da perda de motilidade, diferentes alterações podem ocasionar perda da capacidade fecundante (Bilodeau et al., 2001), exigindo, dessa forma, a necessidade de outros parâmetros para a avaliação espermática ser mais conclusiva.

A integridade da membrana espermática é fundamental ao processo de fecundação, em que alterações como perdas de fluidez da membrana podem determinar redução da motilidade, perda da capacidade fecundante e aumento da permeabilidade de membrana (Armstrong et al., 1999; Rodriguez-Martinez, 2005). Neste trabalho, não houve diferença nos índices de integridade de membrana entre os grupos controle e tratado, sendo ambos inferiores aos índices pré-Percoll. Esses dados mostram uma alta taxa de lesão de membrana espermática após a seleção pelos dois métodos, representando 50% de perda espermática. Sabe-se que alterações de integridade de membranas do espermatozoide podem ser afetadas pelo volume de Percoll e pela força de centrifugação utilizada (Machado et al., 2009). O fato de parâmetros como motilidade e integridade de membrana não terem diferido entre os grupos controle e tratado não significa que não houve diferenças nas lesões causadas aos espermatozoides, pois esses parâmetros só diminuem após uma série de eventos bioquímicos que ocorrem nas células, como, por exemplo, a ação de ROS sobre a membrana plasmática.

Na avaliação da produção de ROS nos diferentes gradientes de mini-Percoll avaliados, pode-se observar uma menor formação de ROS no grupo-tratado em comparação ao grupo-controle (Fig. 1). Embora quantidades controladas de ROS tenham função importante no sêmen, auxiliando no processo de hiperativação/capacitação espermática (De Lamirande e Gagnon, 1993), concentrações excessivas são nocivas, levando à lipoperoxidação da membrana plasmática e à consequente diminuição da capacidade fecundante (Aitken, 1995). Nesse sentido, a quantificação de ROS no sêmen já vem sendo empregada em clínicas de reprodução assistida, visto que elas vêm sendo apontadas como uma das principais causas de infertilidade masculina (Lewis et al., 1997).



*P < 0,05

Figura 1. Intensidade de fluorescência (UF) emitida pela diclorofluoresceína (DCF) em sêmen submetido ao Percoll controle ou tratado.

Os danos causados por ROS em células de mamíferos vêm sendo amplamente estudados nas últimas décadas, sendo a célula espermática uma das mais sensíveis a essas alterações, devido às grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados que compõem sua membrana plasmática (Aitken, 1995). No intuito de minimizar os efeitos dessas ROS, meios de manipulação e seleção espermática são rotineiramente suplementados com diferentes substâncias antioxidantes. Contudo, a exposição dos espermatozoides às altas concentrações de oxigênio, mesmo em curtos períodos, pode ser responsável por geração excessiva de ROS. Pode-se observar no grupo-tratado, em que concentrações menores de Percoll foram utilizadas nos três gradientes, que uma menor produção de ROS foi gerada, indicando uma melhor preservação dos mecanismos antioxidantes do sêmen. Embora as células espermáticas possuam diversos mecanismos que minimizem a toxicidade dos compostos gerados, como os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, suas principais defesas, como a glutatona peroxidase (GPx) e o superóxido dismutase (SOD), são removidas durante a seleção espermática (Bilodeau et al., 2000). Possivelmente essa maior preservação dos mecanismos antioxidantes observada no grupo-tratado esteja relacionada à maior quantidade de antioxidantes presentes no meio de fecundação utilizado na diluição do Percoll, visto que, no grupo-tratado (90, 60 e 30%), houve redução de 15% do volume de Percoll em relação ao grupo-controle.

Cabe ressaltar que, além da sensibilidade da técnica aplicada para quantificar a presença de ROS, a alteração nas concentrações de ROS antecede a redução dos demais parâmetros, sugerindo que, possivelmente com o tempo, os espermatozoides selecionados em gradientes de 90, 60 e 30% de Percoll poderiam apresentar melhor qualidade do que os do grupo-controle, resultando em aumento dos índices de fecundação *in vitro*.



Conclusões

Com base no fato de a seleção espermática por gradientes de 90, 60 e 30% não ter afetado a recuperação e a qualidade dos espermatozoides, ao mesmo tempo em que se observou uma menor produção de ROS, conclui-se que o uso desses gradientes é eficiente na separação espermática, os quais podem ser utilizados em programas de PIV de embriões bovinos.

Agradecimentos

À Central Alta Genetics, por ceder as amostras de sêmen; à FAPERGS (1011575) e ao CNPq (501763/2009-0), pelo suporte financeiro.

Referências

- Aitken RJ.** Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.659-668, 1995.
- Akerlof E, Fredricson B, Gustafsson G, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A.** Comparison between a Swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl*, v.10, p.663-669, 1987.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC.** Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med*, v.26, p.869-880, 1999.
- Barth AD, Oko RJ.** Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-288, 2001.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C.** Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.
- Bollendorf A, Check JH, Katsoff D, Lurie D.** Comparison of Direct Swim-Up, Mini-Percoll, and Sephadex G10 separation procedures. *Arch Androl*, v.32, p. 157-162, 1994.
- Borges JC, Silva MR, Vantini R, Resende MV, Lucio AC, Esper CR, Franceschini, PH.** Comparação dos métodos de seleção de espermatozoides (Percoll x Lavagem) nos índices de produção *in vitro* de embriões bovinos. *Acta Sci Vet*, v.35, supl.3, p.1178, 2007. Resumo.
- Carvalho JO, Machado GM, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN.** Gradiente de Percoll em diferentes volumes, tempo e força de centrifugação na produção *in vitro* e no sexo de embriões bovinos. *Acta Sci Vet*, v.35, supl.2, p.514, 2008. Resumo.
- Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH.** Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production *in vitro*. *Theriogenology*, v.66, p.1185-193, 2006.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR.** *Bioquímica ilustrada*. Porto Alegre: Artmed. 2009.
- Coelho LA, Esper CR, Garcia JM, Vantini R, Almeida Junior IL.** Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Rev Bras Zootec*, v.29, p.397-402, 2000.
- De Lamirande E, Gagnon C.** A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*, v.16, 21-25, 1993.
- Dode M, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE.** The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.69, p.15-23, 2002.
- Gadea J, Garcia-Vazquez F, Matas C., Gardon JC, Canovas S, Gumbao D.** Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl*, v.26, p.396-404, 2005.
- Henkel RE, Schill WB.** Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.108-129, 2003.
- Leivas FG, Brum DS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin, MIB, Silva CAM.** Oxygen tension in the IVM and IVF of bovine oocytes: Effect on the embryonic development and pregnancy rate. *Anim Reprod*, v.3, p.439-445, 2006.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W.** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, v.67, p.142-147, 1997.
- Lomeo AM, Giambero AM.** Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl*, v.14, p.278-282, 1991.
- Machado GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN.** 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.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- Matas C, Vieira L, García-Vásquez FA, Avilés-López K, López-Úbeda R, Carvajal JA, Gadea J.** Effects of



centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod Sci.*, v.127, p.62-72, 2011.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas Jr AJ, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.*, v.16, p.1912-1921, 2001.

Ord T, Patrizio P, Mareello E, Balmaceda JP, Asch RH. Mini-Percoll : a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod.*, v.5, p.987-989, 1990.

Parrish JJ, Suskho-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.

Rodriguez-Martinez H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. Resumo. CDROM.

Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.127-132, 2002.

Way AL, Henault MA, Killian GJ. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1301-1316, 1995.

Walters AH. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *J Androl.*, v.25, p.554-563, 2004.
