

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência dos métodos de seleção espermática (*swim-up*, gradiente de Percoll® e *washing*), na
Fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos

Letícia Bruna Corrêa Penariol

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência dos métodos de seleção espermática (*swim-up*, gradiente de Percoll® e *washing*), na
Fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos

Letícia Bruna Corrêa Penariol

Marcelo Emílio Beletti
Co-orientador: Benner Alves

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência dos métodos de seleção espermática (*swim-up*, gradiente de Percoll® e *washing*), na
Fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos

Letícia Bruna Corrêa Penariol

Marcelo Emílio Beletti
Coorientador: Benner Alves
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela Coordenação do curso de Ciências
Biológicas em ____/____/____

Celine de Melo

Uberlândia-MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência dos métodos de seleção espermática (*swim-up*, gradiente de Percoll® e *washing*), na
Fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos

Letícia Bruna Corrêa Penariol

Aprovado pela Banca Examinadora em: 15/12/2017 Nota: 90

Uberlândia, 15 de Dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus avós, Dirce e meu anjo da guarda Edgard, por toda dedicação, por se abdicarem de tanto para me dar tudo, se hoje cheguei até aqui, foi graças a vocês.

Aos meus pais, Adriano e Daniela, por todo amor, apoio e por sempre acreditarem em mim.

A minha madrinha Michelle, minha tia Gisele, por serem como mães, minhas melhores amigas, meus exemplos de vida, e ao meu tio Missao, meu segundo pai, meu porto seguro, obrigada por sempre me incentivar.

As minhas crianças, vocês são minha força, minha vontade de querer melhorar a cada dia.

As minhas amigas de Uberlândia Ana, Carolina, Maynara, Izadora, Letícia, Daniela, Júlia, Vitória e Amanda, por serem minha família e tornarem a caminhada menos árdua.

As minhas amigas de Jaboticabal, Beatriz, Thaís, Juliana, Bárbara e Brenda, por serem tão presentes mesmo a quilômetros de distância e por todo apoio. E ao Whictor, por me ajudar a evoluir como ser humano e por ser meu ponto de paz nos dias difíceis.

À Universidade por ter me proporcionado tantas oportunidades e aprendizado.

Ao Laboratório de Biologia da Reprodução e em especial a Amanda, por toda ajuda, dedicação, conselhos, puxões de orelha e risadas, sem você este projeto não teria se concretizado.

Ao meu Orientador Dr. Marcelo Emílio Beletti, pela oportunidade, por confiar em mim e por toda disposição em sempre me atender.

Ao meu Co-orientador Dr. Benner Alves, por toda atenção, tempo dedicado as minhas dúvidas, pelos ensinamentos e por toda paciência.

À Deus todo poderoso e todos que tiveram participação nessa minha caminhada.

Influência dos métodos de seleção espermática (*swim-up*, Gradiente de Percoll® e *washing*), na fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Theriogenology*

Fator de impacto = 1,98

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

Resumo

Durante a fertilização *in vitro* (FIV), os espermatozoides precisam passar por uma seleção espermática para se tornarem capazes de fecundar oócitos. Para se obter eficiência na FIV, foram desenvolvidos métodos de seleção espermática. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi analisar a correlação da seleção de espermatozoides com a taxa de crescimento diária e a qualidade dos embriões durante o desenvolvimento. Rotinas de FIV foram realizadas comparando os métodos de seleção Percoll, *Swim-up* e *Washing*, analisando as taxas de clivagem e blastocistos, e fotografando os embriões durante o cultivo *in vitro* para análise diária do crescimento, número de blastômeros e qualidade dos mesmos. Foi observada maior ($P < 0,05$) taxa de clivagem no grupo *Swim-up* em relação ao *Washing*, e no grupo Percoll foi obtida maior ($P < 0,05$) taxa de blastocistos em relação ao *Swim-up*. O grupo *Washing* resultou embriões com qualidade e número de blastômeros inferior ($P < 0,05$) e maior ($P < 0,05$) porcentagem de embriões degenerados que os demais grupos. O número de blastômeros e a taxa de crescimento foram positivamente associados a qualidade do embrião, e em adição, embriões com crescimento moderado e rápido tem mais chances de atingir a fase de blastocisto em relação àqueles com crescimento nulo. Por fim, concluímos que o método de *Washing* afetou negativamente o desenvolvimento embrionário, não sendo um método de seleção recomendado para a FIV. Além disso, a qualidade embrionária e a velocidade da taxa de crescimento podem ser utilizadas como preditores para bons resultados na produção *in vitro* (PIVE).

Abstract

During in vitro fertilization (IVF), spermatozoa need to undergo sperm selection to become capable of fertilizing oocytes. In order to obtain efficiency in IVF, methods of sperm selection were developed. In this sense, the objective of this study was to analyze the correlation of sperm selection with daily growth rate and embryo quality during development. IVF routines were performed comparing Percoll, *Swim-up* and *Washing* methods, analyzing the rates of cleavage and blastocysts, and photographing the embryos during in vitro culture for daily growth analysis, number of blastomeres and quality of the same. A greater ($P < 0,05$) cleavage rate was observed in the *Swim-up* group compared to *Washing*, and in the Percoll group a greater ($P < 0,05$) blastocyst rate was obtained in relation to the *Swim-up*. The *Washing* group resulted in embryos with quality and number of lower blastomeres ($P < 0,05$) and higher ($P < 0,05$) percentage of degenerate embryos than the other groups. The number of blastomeres and the growth rate were positively associated with embryo quality, and in addition, embryos with moderate and rapid growth are more likely to reach the blastocyst stage than those with null growth. Finally, we conclude that the *Washing* method adversely affected embryonic development and is not a recommended screening method for IVF. In addition, embryonic quality and rate of growth rate can be used as predictors for good in vitro production (IVEP) results.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões. Espermatozoides. Crescimento embrionário. Qualidade embrionária. Blastocistos.

Keywords: Embryo production *in vitro*. Spermatozoa. Embryo growth. Embryo quality. Blastocystis.

1. Introdução

A fertilização *in vitro* (FIV) permite a produção de embriões a serem utilizados em investigações científicas, auxílio para o tratamento da infertilidade humana e para aumentar a produtividade de alimentos e conservação de mamíferos ameaçados de extinção)[1]. Esta biotecnologia tem sido estudada a fim de aprimorá-la, desde o processo de maturação dos oócitos, capacitação espermática e fertilização *in vitro* (FIV), até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação [2].

Os espermatozoides, quando ejaculados, ainda não são capazes de fertilizar os oócitos pois primeiramente precisam sofrer mudança fisiológica e morfológica no aparelho reprodutor feminino, conhecidas como capacitação espermática e reação acrossômica, respectivamente [3]. Nesse sentido, durante a FIV, é necessário simular as vias fisiológicas que induzem a capacitação espermática [4], desta forma, a fim de se obter o mesmo sucesso do obtido na fertilização *in vivo*, foram desenvolvidos métodos artificiais de seleção espermática, com o intuito de conseguir o maior número de espermatozoides capazes de fecundar o oótipo, removendo plasma seminal e até mesmo agentes infecciosos [5].

Dentre os métodos de seleção espermática, o método *washing* consiste na lavagem dos espermatozoides em meio artificial e centrifugação para concentrar os espermatozoides [6]. Este procedimento não facilita a seleção de populações viáveis de esperma, e o sedimento oriundo da centrifugação, rotineiramente, contém espermatozoides anormais, de baixa mortalidade e mortos, além de poder conter leucócitos, células epiteliais, resíduos e ser contaminado com microrganismos [7]. O método de gradiente descontínuo de Percoll é o mais antigo e mais utilizado, o sêmen é depositado sobre duas camadas de densidades diferentes (45 e 90%) e submetido a centrifugação, [8]. Este método proporciona maior recuperação de espermatozoides móveis com maior qualidade [6], além de ser considerado rápido e um dos métodos mais eficazes para remover plasma seminal e diluentes crioprotetores [9]. Já o *Swim-up*, que consiste na separação de espermatozoides através da natação dos mesmos, proporciona taxas de recuperação menores de espermatozoides móveis devido

às muitas camadas de sêmen nos níveis mais baixos do sedimento que podem bloquear a possibilidade de alcançar o meio [10]. Entretanto, Spano et al. em 1999 [11], demonstraram que a separação do espermatozoide por *Swim-up* pode melhorar alguns dos parâmetros relacionados ao ensaio da estrutura da cromatina do espermatozoide (SCSA).

Foram relatadas evidências de influência paterna no desenvolvimento embrionário precoce e formação de blastocistos *in vitro* [12]. A qualidade dos blastocistos é considerada um importante preditor de implantação e gravidez [13], todavia, o estágio, avaliação e seleção de embriões continuam sendo um desafio para aumentar as taxas de sucesso nas técnicas de reprodução assistida [14], pois a produção de embriões *in vitro* ainda apresenta diferenças morfológicas e metabólicas em relação aos produzidos *in vivo* [15].

Blastocistos com maior diâmetro são bons indicadores de desenvolvimento embrionário e potencial de implantação [16], porém, à nosso conhecimento, na literatura não existem estudos recentes que correlacionam a seleção de espermatozoides com a taxa de crescimento diária e a qualidade dos embriões durante o desenvolvimento, portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as metodologias de seleção espermática *Swim-up*, Gradiente de Percoll® e *Washing*, e sua associação com o crescimento, desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Campus de Uberlândia.

2.1.1. Obtenção dos espermatozoides

Foram utilizadas 27 doses de sêmen (0,25mL) congeladas, contendo 20 milhões de espermatozoides, provenientes de uma empresa especializada, de um touro da raça Nelore, previamente utilizado em rotinas de fertilização *in vitro* pelo grupo de pesquisa.

2.1.2. Obtenção e seleção de oócitos

Ovários foram coletados no Frigorífico Real, na cidade de Uberlândia, e transportados para o laboratório em solução fisiológica a 30-33°C. A aspiração dos folículos antrais de 3 a 8 mm foi feita com agulha de 19-g acoplada a uma seringa de 10 mL. O fluido folicular obtido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e, após 15 minutos, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 90 x 15 mm e avaliado em microscópio estereoscópico para a realização do rastreamento dos oócitos.

Os oócitos obtidos no rastreamento foram classificados, sendo selecionados apenas oócitos de graus 1, 2 e 3 para o experimento, ou seja, os que apresentavam no mínimo quatro camadas de células do cumulus e citoplasma de coloração uniforme. Os oócitos não selecionados, considerados atrésicos e desnudos, foram descartados.

2.1.3. Maturação *in vitro* (MIV)

Oócitos selecionados foram lavados uma vez em meio TCM – 199 HEPES (0,2mM piruvato sódico, 10mM HEPES ácido, 10mM de HEPES sódico, 5mM bicarbonato de sódio, 83 μ g/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2mM piruvato sódico, 26mM bicarbonato de sódio, 83 μ g/mL de amicacina, 1 μ g/mL FSH, 5 μ g/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Foram transferidos 20 oócitos por gota de 100 μ L de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 h em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

2.1.4. Métodos de seleção espermática

2.1.4.1. Gradiente de Percoll®

Uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria, a 36°C durante 30 s. O sêmen foi depositado em um tubo de 15 mL sobre um gradiente descontínuo de densidade de Percoll (45 e 90%) e centrifugado à temperatura ambiente por 30 min a 1395 g, com intuito de selecionar os espermatozoides viáveis. Foram transferidos 30 µL do sedimento formado para um microtubo contendo 30 µL de meio Fert-TALP (suplementado com 0,2mM piruvato sódico, 20,4µM penicilamina, 10,2µM hipotaurina, 1,97µM epinefrina, 10µg/mL heparina, 6mg/mL BSA e 83µg/mL amicacina).

2.1.4.2. *Swim-up*

Uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 36°C durante 30 s. Em tubos cônicos de 15 mL foram depositados 100 µL de sêmen sob 1 mL de meio Sperm-TALP (Tyrode's-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina) e, após incubação de 45 min a 1 h em estufa (38,5°C, 5% CO₂ e 100% de umidade) com declividade de 45°, foram transferidos 800 µL do sobrenadante de cada tubo para outro tubo de 15 mL (não ultrapassando o volume máximo de 3,6 mL) e após centrifugação à temperatura ambiente por 10 min a 700 g foram transferidos 200 µL do sedimento formado para um microtubo.

2.1.4.3. *Washing*

Uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria, a 36°C durante 30 s, e foi depositada em um tubo côncico de 15 mL contendo 2 mL de meio Sperm-TALP. Após homogeneização e centrifugação à temperatura ambiente por 5 min a 260 g, o sobrenadante foi descartado e então foi realizada a segunda centrifugação nas mesmas condições que a primeira. Foram transferidos 30 µL do sedimento formado para um microtubo contendo 30 µL de meio Fert-TALP.

2.1.5. Fecundação *in vitro* (FIV)

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e transferidos para gotas, de 100 µL do mesmo meio, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm. Gotas foram distribuídas aleatoriamente a fim de compor os grupos experimentais, caracterizados pelos diferentes métodos de seleção espermática, gradiente de Percoll, *Swin-up* e *Washing*.

Após a realização da seleção espermática, de acordo com cada grupo experimental, foram retiradas, de cada sedimento previamente separado como descrito anteriormente, duas alíquotas de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 25 mil espermatozoides viáveis/µL e então cerca de 100x10³ espermatozoides foram adicionados por gotas de cada grupo, em seguida, foram incubados por 18 a 20 horas em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A contagem da clivagem foi realizada 48 horas após a FIV.

2.1.6. Cultivo *in vitro* (CIV)

Foram cultivados no total 747 prováveis zigotos, os quais durante as rotinas foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens a fim de remover as células do *cumulus*, foram lavados três vezes em meio SOF (acrescido de 0,2mM piruvato sódico, 5mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83µg/mL amicacina) e transferidos para gotas de 100µL do mesmo meio, cobertas por óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 35 x 10 mm. Adicionou-se em média 5 zigotos por gota, referentes ao mesmo método de seleção espermática, e foram cultivados por 6 dias em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação de acordo com as normas preconizadas pela *International Embryo Transfer Society*.

2.2. Desenvolvimento embrionário, qualidade e diâmetro.

Para avaliação do desenvolvimento embrionário, qualidade e diâmetro dos prováveis embriões, imagens foram capturadas durante todos os dias do cultivo *in vitro*. Para a captura de imagens foi utilizado uma câmera Nikon Digital Sight DS-Fi2 acoplada a um microscópio estereoscópico Nikon AZ100 em aumento de 4x. Os prováveis embriões de cada imagem foram avaliados individualmente quanto a qualidade e número de blastômeros. A avaliação da qualidade foi realizada de acordo com as normas estabelecida pela *International Embryo Transfer Society* utilizando a seguinte classificação: excelente (4) para os que apresentavam blastômeros de coloração mais homogênia e mais escura, bom (3) aqueles com blastômeros não tão homogêneos e escuros, ruim (2) para os que possuíam blastômeros de cor mais heterogênea e mais clara, e degenerado (1). A classificação quanto ao número de blastômeros foi realizada de acordo com Ushijima, 2009 [17]. O software Image J foi utilizado a fim de se obter os diâmetros horizontais e verticais, com ou sem a zona pelúcida, em μm .

2.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). As variáveis apresentadas na forma de porcentagem foram comparadas entre os grupos e dias de cultivo pelos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher. A comparação de médias entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto as médias entre os dias de cultivo foram analisadas pelo teste pareado de Wilcoxon. A análise de regressão linear avaliou a associação da qualidade embrionária com o número de blastômeros e taxa de crescimento follicular. Em adição, a razão de possibilidades (Odds ratio) e o intervalo de confiança foram calculados para avaliar os efeitos do método de seleção espermática e da categoria de crescimento sobre a produção de blastocisto. Os dados foram apresentados na forma de média (\pm erro padrão da média) e porcentagem e a significância estatística definida quando $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Morfologia e qualidade embrionária

No presente estudo, o total de 747 oócitos foram submetidos aos processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. O efeito do método de seleção espermática (Percoll, *Swim-up* e *Washing*) sobre as taxas de clivagem e produção de blastocistos foi observado (Tabela 1). A taxa de clivagem foi superior no grupo *Swim-up* ($P < 0,05$) em relação ao *Washing*, enquanto o grupo Percoll não diferiu ($P > 0,05$) dos demais grupos. A produção de blastocistos foi maior ($P < 0,05$) no grupo Percoll em comparação ao *Washing*. No entanto, quando a proporção de blastocisto foi calculada em função do número de oócitos clivados, o grupo Percoll apresentou taxa superior ($P < 0,05$) em relação ao *Swim-up* e não diferiu do *Washing*.

A distribuição dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento após o uso de diferentes métodos de seleção espermática é demonstrada (Figura 1). O grupo *Swim-up* apresentou superior ($P < 0,05$) proporção de mórula no dia 4 (D4) do cultivo em relação ao Percoll (Figura 1A). No D5 e D6, maior ($P < 0,05$) proporção de mórula foi observada no grupo Percoll em comparação ao *Washing*. Quando analisado dentro do grupo, e entre dias de cultivo, a proporção de mórula no D5 aumentou ($P < 0,05$) somente no grupo Percoll. No geral, a produção de mórulas reduziu ($P < 0,05$) entre D5 e D7, independente do grupo. A porcentagem de blastocisto inicial e blastocisto foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos em D5 e D6 do cultivo, no entanto, maior ($P < 0,05$) proporção no D7 foi observada no grupo Percoll (Figura 1B). Dentro do mesmo grupo, a proporção de blastocisto inicial e blastocisto não diferiu entre os dias D6 e D7 do cultivo. Em relação a produção de blastocisto expandido e eclodido, não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os grupos (Figura 1C). No geral, a porcentagem de blastocisto expandido e eclodido aumentou ($P < 0,05$) entre D6 e D7 em todos os grupos.

A qualidade dos embriões durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática foi avaliada (Figura 2A). No D4 do cultivo os embriões do grupo *Swim-up* apresentaram qualidade superior ($P < 0,05$) em relação aos do *Washing*. No D5, os grupos Percoll e

Swim-up diferiram do *Washing*, apresentando qualidade superior ($P < 0,05$), enquanto no D6 a qualidade foi maior ($P < 0,05$) no grupo Percoll comparado ao *Washing*. Independente do grupo, a qualidade embrionária decresceu ($P < 0,05$) a partir do D4 do cultivo.

A porcentagem de embriões degenerados durante o cultivo aumentou ($P < 0,05$) progressivamente em todos os grupos (Figura 2B). O grupo *Swim-up* apresentou menor ($P < 0,05$) porcentagem de embriões degenerados nos dias D3 e D4 comparado ao *Washing*. Em D5 e D6, menor ($P < 0,05$) proporção de embriões degenerados foi observado no grupo Percoll em relação ao *Washing*.

A média de blastômeros por embrião ao longo do cultivo aumentou ($P < 0,05$) progressivamente, independente do grupo (Figura 2C). Os embriões do grupo Percoll apresentaram maior ($P < 0,05$) número de blastômeros quando comparado ao *Washing*, durante os dias de cultivo, exceto no D1. A média de blastômeros do grupo *Swim-up* foi superior ($P < 0,05$) em relação ao *Washing* apenas no D5 do cultivo. Em adição, a análise de regressão linear demonstrou a associação positiva ($P < 0,001$) entre a qualidade embrionária e o número de blastômeros (Figura 2D).

3.2 Diâmetro, taxa de crescimento e formação de blastocistos

O diâmetro embrionário durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática foi avaliado (Tabela 2). No geral, o diâmetro dos embriões não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos durante o cultivo. Quando comparado em relação ao D1 do cultivo, observamos em todos os grupos uma redução ($P < 0,05$) do diâmetro embrionário no D4 seguido de um aumento progressivo ($P < 0,05$) até o D7.

A taxa geral (D1-D7) de crescimento embrionário ($\mu\text{m}/\text{dia}$) foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos (Tabela 3). Em relação ao intervalo D1-D2, todos os grupos apresentaram uma redução ($P < 0,05$) da taxa de crescimento até o período D3-D4, no entanto, somente os grupos Percoll e *Swim-up* retomaram ($P < 0,05$) o crescimento ao final do cultivo. O grupo *Washing* apresentou menor ($P < 0,05$) taxa de crescimento no intervalo D6-D7 em comparação os grupos Percoll e *Swim-up*. Em

adição, a taxa de crescimento foi positivamente associada ($P < 0,001$) com a qualidade do embrião, conforme demonstrado pela análise de regressão (Figura 6).

A distribuição da frequência dos embriões classificados de acordo com a taxa de crescimento em nulo, moderado e rápido foi demonstrada (Figura 7A). Observamos uma maior porcentagem ($P < 0,05$) de embriões com crescimento nulo no grupo *Washing* em comparação ao Percoll e *Swim-up*. A proporção de embriões das categorias de crescimento moderado e rápido não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos (Figura 7B). A associação entre as categorias de crescimento embrionário e a porcentagem de produção de blastocistos foi demonstrada (Tabela 4). Embriões com crescimento moderado e rápido tem ~2 e ~48 vezes, respectivamente, mais chances ($P < 0,001$) de atingirem a fase de blastocisto em relação àqueles com crescimento nulo. Além disso, embriões com crescimento rápido tem ~19 vezes mais chances de formarem blastocisto do que aqueles com crescimento moderado. Finalmente, o estudo da associação entre os métodos de seleção espermática e a porcentagem de blastocistos (Tabela 5) indicou que os embriões do grupo Percoll tem 1.5 vezes mais chances ($P < 0,05$) de formarem blastocistos quando comparados ao *Washing*.

4. Discussão

Inúmeros fatores influenciam a eficiência da (PIVE) entre eles o método de seleção espermática adotado [18]. Assim, parâmetros espermáticos pré e pós seleção como motilidade progressiva, viabilidade, concentração, reação acrossomal, fragmentação do DNA, compactação e heterogeneidade da cromatina são amplamente avaliados e podem ser utilizados como preditores da fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário inicial [19-20]. Em adição, as anormalidades genéticas e epigenéticas do espermatozoide, como o dano do DNA, os erros de impressão genômica e as malformações dos centrossomas, podem contribuir para uma qualidade embrionária inferior [21]. No entanto, neste estudo avaliamos a influência do método de seleção espermática (Percoll, *Swim-up* e *Washing*) sobre a dinâmica de desenvolvimento embrionário com enfoque na taxa de crescimento e morfologia do embrião.

No presente estudo, o grupo *Swim-up* apresentou taxa de clivagem superior em relação ao *Washing*, enquanto a proporção de blastocistos em função do número de oócitos clivados foi superior no grupo Percoll em comparação ao *Swim-up*. Além disso, a frequência de distribuição dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento foi analisada. No geral, o grupo *Swim-up* apresentou maior proporção de mórula no D5 em relação ao *Washing*, enquanto no D7 maior porcentagem de blastocisto inicial e blastocisto foi verificada no grupo Percoll. Arias et al. (2016) [22] descreveu que a separação por Percoll gerou maior porcentagem de espermatozoides com membrana acrosomal intacta quando comparado ao *Swim-up*. Kim et al. (2013) [23] observaram um efeito prejudicial na motilidade e PMI (*plasma membrane integrity*) dos espermatozoides quando utilizaram o método de *Washing* com apenas uma centrifugação. Além do efeito maternal, o fator paterno também pode influenciar a PIVE, apesar de vários estudos [24-25] demonstrarem que a diferença na taxa de clivagem e produção de blastocistos entre os embriões provavelmente esteja associado ao genótipo materno. Estudos relataram que níveis mais elevados de fragmentação de DNA nos espermatozoides têm sido associados com menores taxas de formação de blastocistos, e também que os embriões derivados de espermatozoides com altos níveis de dano do DNA são menos propensos a alcançar estágio de blastocisto. Em adição, um recente estudo demonstrou uma correlação negativa entre a fragmentação do DNA do espermatozoide com taxas de blastocistos e gravidez mesmo com oócitos de boa qualidade [26-27]. Os altos níveis de dano do DNA interromperam o desenvolvimento dos embriões e induziram a apoptose [28].

Neste estudo, a qualidade dos embriões decresceu ao longo do cultivo independentemente do método de seleção espermática utilizado, mais precisamente a partir do D4. No D4, os embriões do grupo *Swim-up* apresentaram qualidade superior em comparação ao *Washing*, e no D6 o grupo Percoll teve embriões com qualidade melhor do que o *Washing*, enquanto que em D5 ambos os grupos demonstraram superioridade em relação ao *Washing*, porém ao final do cultivo a qualidade dos embriões foi similar. Da mesma forma, a porcentagem de embriões degenerados aumentou durante o cultivo e não diferiu entre os grupos no D7, entretanto, em comparação ao *Washing*, em D3 e D4 o

grupo *Swim-up* demonstrou porcentagem menor, bem como o Percoll nos dias D5 e D6. Pierre Vanderzwalmen (2008) [29] analisou o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocistos levando em consideração a correlação com o tipo de espermatozoides utilizados na FIV e observou aumento significativo na taxa de blastocistos de alta qualidade quando espermatozoides desprovidos de vacúolos nucleares grandes foram selecionados. Além disso, Knez et al. (2013) [30] observaram que, blastocistos derivados de espermatozoides morfologicamente normais sem vacúolos, requeriam menor tempo para realizar todos os eventos do desenvolvimento embrionário em comparação com blastocistos provenientes de espermatozoides com baixa qualidade. Adicionalmente, as desregulações no equilíbrio *redox* (reações oxidativas) induzem retardo no desenvolvimento, malformações de órgãos, teratogênese e até mesmo letalidade embrionária [31]. Pelo fato do *Washing* ser apenas um método de lavagem e não de seleção espermática, supomos que essa seja uma possível causa da qualidade inferior de seus embriões e do maior número de degenerados. Possivelmente, o oxigênio pode ter sido um fator contribuinte para tais resultados, já que é essencial durante o desenvolvimento embrionário [32]. Além disso, quando usado como substrato de energia, representa um risco potencial através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Por essas espécies serem aceitadoras de elétrons altamente ativos, são capazes de tirar elétrons de outras moléculas para se tornarem radicais livres, podendo modificar macromoléculas biológicas (lipídios, proteínas, RNA e DNA) prejudicando sua função [33]. No presente estudo, na fase de cultivo, os embriões foram cultivados em grupos de cinco por gota e não foi realizada troca de meio, desta forma, supomos que a produção de metabólitos pode ter afetado a qualidade e o desenvolvimento dos embriões.

A média do número de blastômeros por embrião aumentou progressivamente ao longo do cultivo e os embriões dos grupos Percoll e *Swim-up* apresentaram quantidade superior de células em relação ao *Washing*. Além disso, a análise de regressão linear demonstrou a associação positiva entre qualidade do embrião e número de blastômeros. A classificação morfológica embrionária possui grande importância para inúmeras técnicas laboratoriais, desde pesquisas básicas às aplicadas na

reprodução assistida. [34]. Os blastômeros são células totipotentes, as quais têm a capacidade natural de uma célula para produzir, através de divisões sucessivas, um indivíduo inteiro [35], por isso a importância do estudo dos blastômeros. Um estudo revelou fatores que alteram a integridade dos blastômeros afetando a taxa de nascimento, com a presença de multinucleação no estágio de duas células e mais especificamente em ambos os blastômeros, evidenciando um impacto negativo significativo no potencial de nascimento [36]. Fernandez Gallardo et al. (2016) [37], ao estudarem embriões humanos, concluíram que o número específico de blastômeros presentes é um fator determinante na taxa de implantação de embriões vitrificados. A nosso conhecimento não há na literatura pesquisas que relacionam métodos de seleção espermática com o número de blastômeros e qualidade dos embriões, sendo este, um ponto inovador deste estudo.

No geral, o diâmetro e a taxa de crescimento embrionário não diferiram entre os grupos ao longo do cultivo. No entanto, observamos uma redução na taxa de crescimento no período D3-D4 em todos os grupos e somente Percoll e *Swim-up* retomaram o crescimento ao final do cultivo. Em adição, a taxa de crescimento foi positivamente associada com a qualidade do embrião pela análise de regressão linear. Foi verificada a distribuição de frequência dos embriões quanto a velocidade da taxa de crescimento (nulo, moderado e rápido), o grupo *Washing* apresentou maior porcentagem de embriões com crescimento nulo quando comparado aos demais grupos. A análise de *odds ratio* entre as categorias de crescimento embrionário e a porcentagem de produção de blastocistos, demonstrou que os embriões com crescimento moderado e rápido tem aproximadamente de 2 a 48 vezes, respectivamente, mais chances de formarem blastocistos em relação àqueles com crescimento nulo. Além disso, embriões do grupo Percoll tem 1,5 vezes mais chances de formarem blastocistos quando comparado ao *Washing*. Segundo Ochota e Nizanski (2016) [38], embriões felinos capazes de avançar o desenvolvimento *in vitro* foram clivados antes das 24 horas enquanto que, embriões clivados entre 24 e 30 horas, não conseguiram atingir o estágio de blastocisto. Além disso, Teseraki (2005) [39] concluiu que embriões de morfologia pobre, e de clivagem lenta, provavelmente são consequências de um mecanismo de autodefesa contra aneuploidia e dano do DNA. Adicionalmente, Berger et. al

(2011) [40] reportaram que o embrião, embora possa controlar os baixos níveis de danos do DNA introduzidos pelo núcleo do espermatozoide, a não reparação nesse dano pode comprometer a transmissão completa e precisa de informações genéticas para o embrião. Embriões crescem, ecodem e se alongam para conseguir implantar e dar início a gestação. Acreditamos que o tempo pode ser um fator preditivo efetivo para a boa qualidade de embriões e desenvolvimento embrionário, em estudo, Garcia et al. (2015) [41] observaram que os embriões de clivagem rápida obtiveram maiores taxas de blastocisto do que os embriões de clivagem lenta, o qual apresentou maiores taxas de bloqueio do desenvolvimento no quarto ciclo celular. Supomos também que, a qualidade embrionária é um preceito importante a ser considerado para o desenvolvimento embrionário, já que foi uma variável dependente para mais de um critério avaliado (número de blastômeros e taxa de crescimento embrionário). Os embriões de clivagem lenta podem ter maior incidência de anormalidades cromossômicas, alteração da expressão gênica e quebra da dupla cadeia de DNA em comparação com embriões de clivagem rápida [42-43]. Somado a isso, outro estudo também mostrou que embriões de desenvolvimento rápido apresentaram melhor qualidade do que embriões com desenvolvimento lento [44]. Não encontramos na literatura pesquisas que relacionem o diâmetro embrionário, taxa de crescimento e morfologia do embrião aos métodos de seleção espermática, ressaltando o aspecto inovador do presente estudo.

Por fim concluímos que, o método de seleção espermática utilizado, afetou o desenvolvimento embrionário inicial. Os grupos Percoll e *Swim-up* não diferiram entre si, para a maior parte das variáveis estudadas, todavia o método *Washing* afetou negativamente o desenvolvimento embrionário, já que apresentou menor número de clivados e blastocistos, menor qualidade embrionária e maior número de degenerados em relação aos demais grupos, desta forma, o consideramos um método de seleção não recomendado para a FIV. Adicionalmente, observamos que a qualidade embrionária e a velocidade da taxa de crescimento podem ser utilizadas como preditores para bons resultados na PIVE. A associação entre fertilidade masculina e desenvolvimento embrionário após transferência de embriões deve ser investigada no futuro. Além disso, é de suma

importância estudar se a integridade e condensação do DNA, alterações epigenéticas nos espermatozoides e os tipos de espermatozoides selecionados, tem efeito sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário, a fim de se obter maior número de embriões produzidos com qualidade, promovendo sucesso na utilização da PIVE.

Referências

1. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization, *Reproduction*, 2002, vol. 124 (pg.181 - 196).
2. Hoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 2003 59:675-685
3. Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. Ed. por Knobil, E. & Neill, J.D., Raven Press, Ltd., New York, Cap. 5: 189- 317, 1994.
4. Visconti, PE, and Kopf, GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998; 59: 1-6
5. Thilagavathi, Venkatesh, S, Kumar, R, and Dada, R. (2012) Segregation of sperm subpopulations in normozoospermic infertile men. *Syst Biol Reprod Med* 58:313-18.
6. Somfai, T, Bodo, S, Nagy, S, Papp, AB, Ivancsics, J, Baranyai, B, et al. (2002) Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 37:285-90.
7. Santiago-Moreno, J, Carvajal, A, Astorga, RJ, Coloma, MA, Toledano-Díaz, A, Gómez Guillamón, F, Salas-Vega, R, López-Sebastián, A. 2011. Potential impact of diseases transmissible by sperm on the establishment of Iberian Ibex (*Capra pyrenaica*) genome resource banks. *Eur. J. Wildl. Res.* 57, 211-216
8. García-Herreros M, Leal CL. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. *Syst Biol Reprod Med.* 2014;60:338-47.
9. Lee, HL, Kim, SH, Ji, DB, and Kim, YJ (2009). A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci* 10: 249-55.
10. Cesari, A, Kaiser, GG, Mucci, N, Mutto, A, Vincenti, A, Forne's, MW, et al. (2006) Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 66:1185-93.
11. Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Variações de cromatina nuclear nos espermatozóides humanos submetidos a piscadear e criopreservação, que foram avaliadas pelo ensaio de estrutura de cromatina de esperma citométrico de fluxo. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5:29-37.
12. Tesarik J, Greco E, Mendoza CL. But not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004; 19:611-615. doi: 10.1093/humrep/deh127.
13. Thurin A, Hardarson T, Hausken J, Jablonowska B, Lundin K, Pinborg A and Bergh C (2005) Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. *Hum Reprod* 20,1876-1880

14. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, et al. Tecnologia de reprodução assistida na Europa, 2009: resultados gerados a partir de registros europeus pela ESHRE. *Hum Reprod*. 2013; 28 : 2318-31. doi: 10.1093 / humrep / det278.
15. Sá, W.F. et al. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 287-292, June 2003
16. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Thomas S. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril* 2008;90:302-9.
17. Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. Classification of morphological changes based on the number of cleavage divisions in bovine embryos. *J Reprod Dev* 2009;55:83-7.
18. Samardzija, Marko et al. Effects of Bovine Spermatozoa Preparation on Embryonic Development in Vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4 (2006): 58. PMC. Web. 5 Dec. 2017.
19. WHO - World Health organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
20. Alvarez Sedó C, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblia F, Longobucco V, Lagar Ev, Nodar F. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction* 2017; 00(0):000-000 doi: 10.5935/1518-0557.20170061.
21. Emery BR, Carrell DT. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl*. 2006;8(2):131-142. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00127.x.
22. Arias ME, Andara K, Briones E, et al. Bovine sperm separations by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 2017. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.002.
23. Kim S, Agca C, Agca Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2012; doi: 10.1071/RD12212.
24. Armas, RD, Solano R, Riego E, Pupo CA, Aguilar A, Ramos B, Aguirre A, Fuent JDL, Castro FO. Use of F1 progeny of Holstein x Zebu cross cattle as oocyte donors for in vitro embryo production and gene microinjection. *Theriogenology*, 42 (1994), pp. 977-985.
25. Boediono A, Suzuki T, Godke RA, Comparison of hybrid and purebred in vitro derived cattle embryos during in vitro culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 78 (2003), pp.1-11.
26. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2004;81:1289-1295. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.063.

27. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:198–205. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60959-5.
28. Sedó, CA., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, EV., Nodar, F. (2017). Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction*, 21(4), 343–350. <http://doi.org/10.5935/1518-0557.20170061>
29. Vanderzwalmen, P, Hiemer, A, Rubner, P, et al., 2008. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod. BioMed. Online* 17, 617–627.
30. Knez K, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Development dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27:161-171. Doi: 10.1016/j.rbmo.2013.04.002.
31. Hansen J. M. (2006). Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 78, 293–30710.1002/bdrc.20085
32. Tuuli M. G., Longtine M. S., Nelson D. M. (2011). Review: oxygen and trophoblast biology – a source of controversy. *Placenta* 32(Suppl. 2), S109–S11810.1016/j.placenta.2010.12.013
33. Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2011;4:12. doi:10.3389/fnmol.2011.00012.
34. Matos, FD. Software baseado em rede neural artificial desenvolvido por meio de algoritmo genético para a classificação morfológica de blastocistos bovinos. 2014. 127 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Assis, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115875>>.
35. VerMilyea, Matthew D et al. “Transcriptome Asymmetry within Mouse Zygotes but Not between Early Embryonic Sister Blastomeres.” *The EMBO Journal* 30.9 (2011): 1841–1851. PMC. Web. 5 Dec. 2017.
36. Desch, L, Bruno, C, Luu, M. Embryo multinucleation at the two-cell stage is an independent predictor of intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril*. 2017;107(1):97–103.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.022.
37. Fernandez Gallardo E, Spiessens C, D’Hooghe T, Debrock S. Effect of embryo morphology and morphometrics on implantation of vitrified day 3 embryos after warming: a retrospective cohort study. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 2016;14:40. doi:10.1186/s12958-016-0175-8.
38. Ochota, Małgorzata & Niżański, Wojciech. (2016). Time of early cleavage affects developmental potential of feline preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*. 89.10.1016/j.theriogenology.2016.10.002.
39. Tesarik, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod. Biomed. Online*. 2005; 10: 370–375

40. Berger, D.S., Abdelhafez, F., Russell, H., Goldfarb, J., and Desai, N. Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011; 22: 37
41. Garcia SM, Marinho LSR, Lunardelli PA, Seneda MM, Meirelles FV. Developmental Block and Programmed Cell Death in *Bos indicus* Embryos: Effects of Protein Supplementation Source and Developmental Kinetics. Hansen PJ, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0119463. doi:10.1371/journal.pone.0119463
42. Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, et al. Promising System for Selecting Healthy In Vitro-Fertilized Embryos in Cattle. Tian X (Cindy), ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36627. doi:10.1371/journal.pone.0036627.
43. Bohrer RC, Che L, Gonçalves PBD, Duggavathi R, Bordignon V. Phosphorylated histone H2A.x in porcine embryos produced by IVF and somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*. 2013;146:325–333. doi: [10.1530/REP-13-0271](https://doi.org/10.1530/REP-13-0271).
44. Market Velker BA, Denomme MM, Mann MRW. Loss of Genomic Imprinting in Mouse Embryos with Fast Rates of Preimplantation Development in Culture. *Biology of Reproduction*. 2012;86(5):143. doi:10.1095/biolreprod.111.096602.

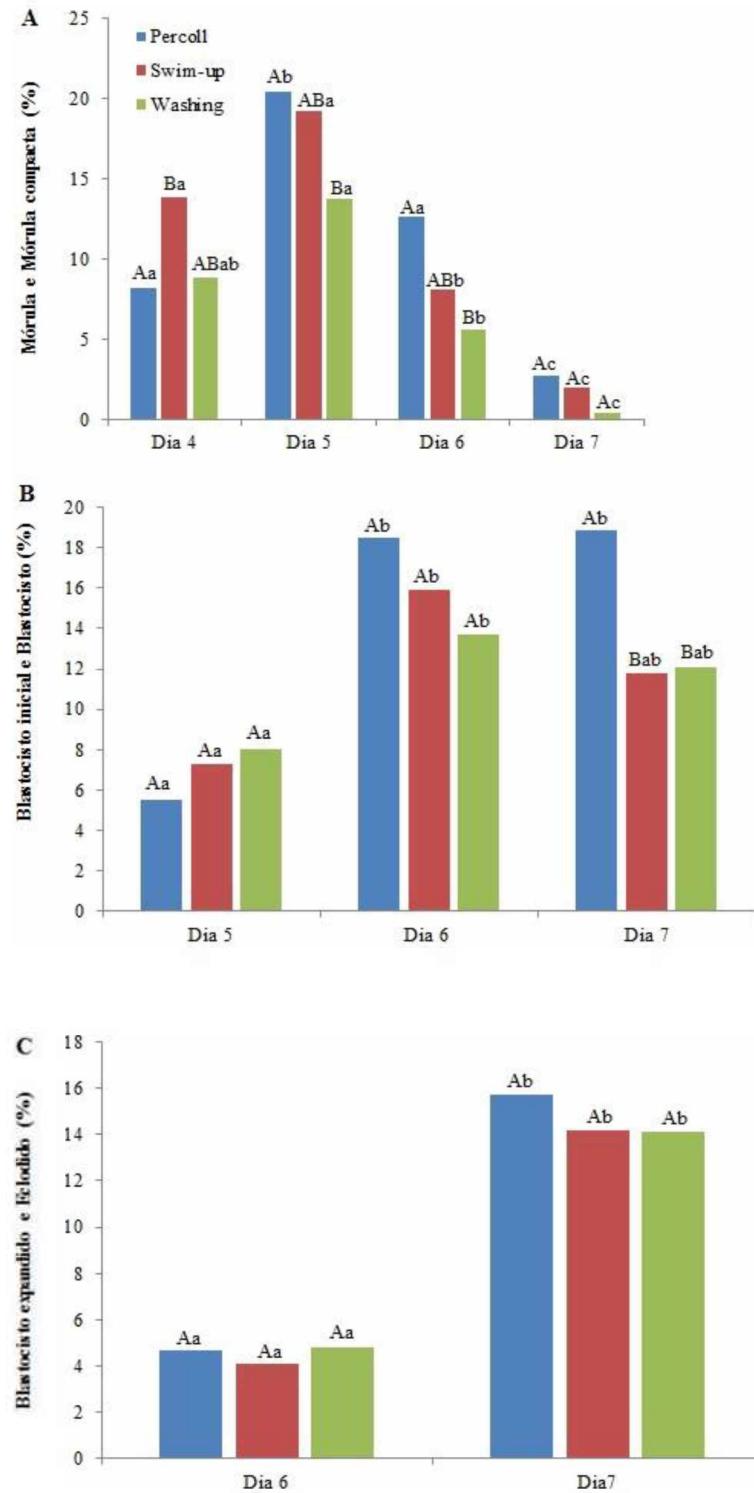


Figura 1. Proporção de embriões bovinos classificados quanto ao estágio de desenvolvimento após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing). (A) Mórula e mórula compacta; (B) Blastocisto inicial e blastocisto; (C) Blastocisto expandido e blastocisto eclodido.

^{A,B} Dentro do dia, letras diferentes indicam significância estatística ($P < 0,05$).

^{a,b,c} Dentro do grupo, letras diferentes indicam significância estatística ($P < 0,05$).

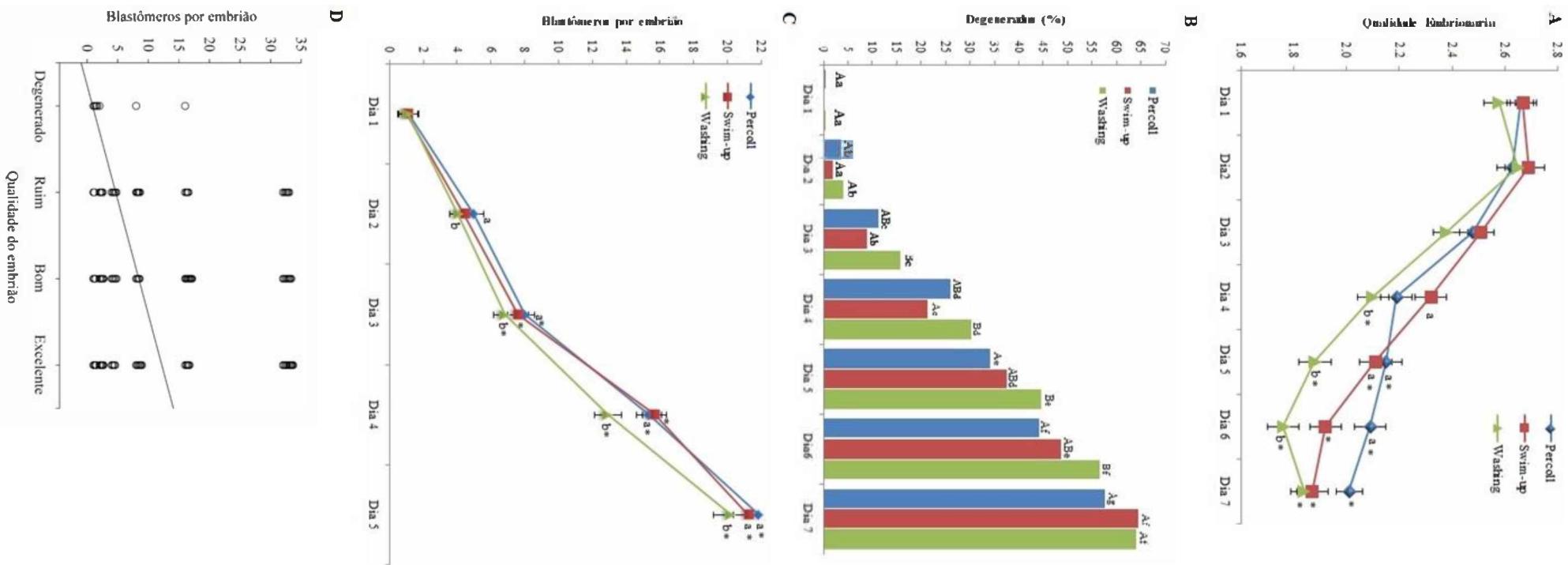


Figura 2. Qualidade (Média \pm epm) de embriões bovinos durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing). A média dentro de cada dia foi calculada após a classificação dos embriões quanto a qualidade em: 4 = excelente; 3 = bom; 2 = ruim; 1 = degenerado (A); porcentagem de embriões bovinos degenerados durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing) (B); média (\pm epm) de blastômeros por embrião durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing) (C); Associação entre qualidade embrionária e número de blastômeros por embrião bovinos produzidos *in vitro* com diferentes tipos de seleção espermática. Cada círculo no gráfico representa um embrião avaliado ($n = 747$). A análise de regressão linear está representada pela reta e equação [Qualidade do embrião = $2,568 + (0,0164 \times$ número de blastômeros); $r = 0,25$; $R^2 = 0,06$; $P < 0,001$]. Os embriões avaliados foram classificados quanto a qualidade (variável dependente) em: 4 = excelente; 3 = bom; 2 = ruim; 1 = degenerado (D).

^{a,b} Letras diferentes dentro do mesmo dia e entre os grupos indicam significância estatística ($P < 0,05$).

^{A,B} Dentro do dia, letras diferentes indicam significância estatística ($P < 0,05$).

^{a,b,c,d,e,f,g} Dentro do grupo, letras diferentes indicam significância estatística ($P < 0,05$).

* Difere do dia 1 dentro do grupo ($P < 0,05$).

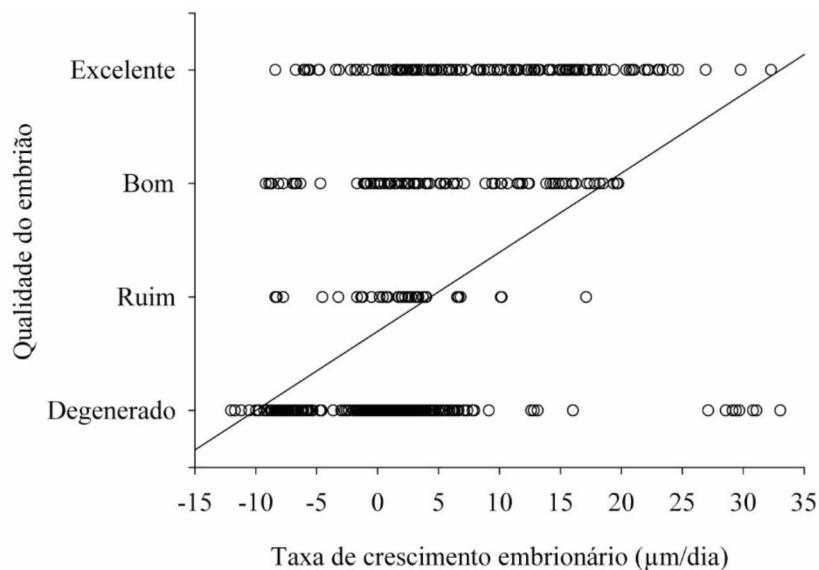


Figura 6. Associação entre qualidade embrionária e taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) de embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes tipos de seleção espermática. Cada círculo no gráfico representa um embrião avaliado ($n = 747$). A análise de regressão linear está representada pela reta e equação [Qualidade do embrião = $1,697 + (0,0696 \times \text{taxa de crescimento})$]; $r = 0,42$; $R^2 = 0,18$; $P < 0,001$]. Os embriões avaliados foram classificados quanto à qualidade (variável dependente) em: 4 = excelente; 3 = bom; 2 = ruim; 1 = degenerado.

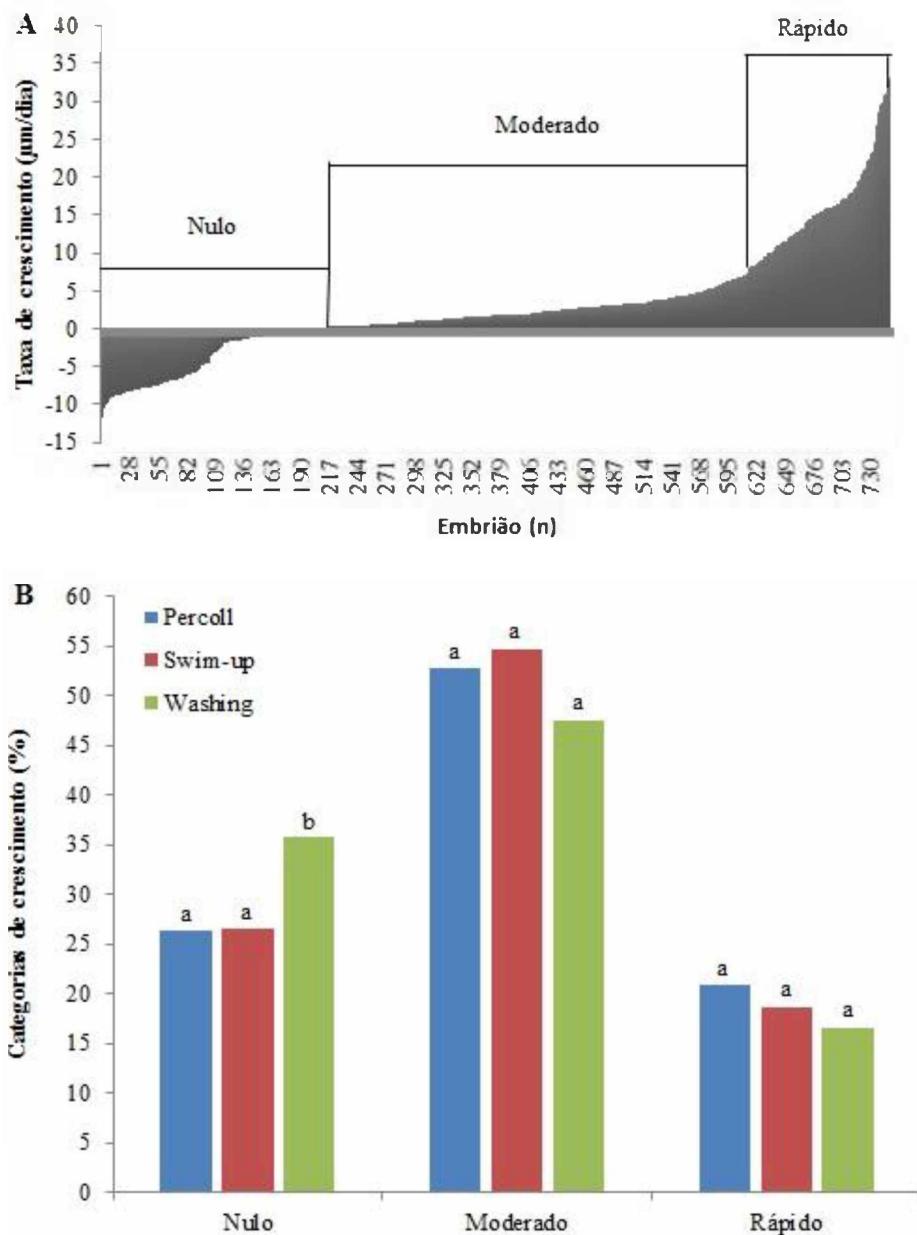


Figura 7. (A) Representação de embriões classificados de acordo com as taxas de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) em nulo, moderado (0,1 a 7,0 $\mu\text{m}/\text{dia}$) e rápido ($> 7,1 \mu\text{m}/\text{dia}$). (B) Distribuição da frequência de embriões bovinos em categorias de crescimento durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing).

^{a,b} Letras diferentes dentro da mesma categoria de crescimento indicam significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 1. Taxa de clivagem e produção de blastocistos bovinos após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing).

Grupo	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Blastocisto/Nº de oócitos clivados (%)
Percoll	70,1 (178/254) ^{AB}	34,6 (88/254) ^A	49,4 (88/178) ^A
Swim-up	72,6 (178/245) ^A	26,9 (66/245) ^{AB}	37,1 (66/178) ^B
Washing	62,9 (156/248) ^B	25,4 (63/248) ^B	40,3 (63/156) ^{AB}

^{A,B} Letras diferentes dentro da coluna indicam significância estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2. Diâmetro (Média \pm epm) embrionário durante o cultivo *in vitro* após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing) na fertilização *in vitro* de bovinos.

Grupo	Cultivo <i>in vitro</i> - Diâmetro (μm)						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Percoll	211,3 \pm 0,9	212,1 \pm 1,4	212,6 \pm 1,2	200,2 \pm 2,0 *	207,6 \pm 1,8	215,7 \pm 2,4 *	231,3 \pm 3,2 *
Swim-up	210,1 \pm 1,0	216,4 \pm 1,7	213,2 \pm 1,2	200,1 \pm 2,1 *	206,7 \pm 1,8	214,7 \pm 2,2 *	228,7 \pm 2,9 *
Washing	212,5 \pm 0,9	216,2 \pm 1,8	213,3 \pm 1,4	203,0 \pm 2,3 *	208,9 \pm 2,0	217,6 \pm 2,4 *	225,6 \pm 2,9 *

* Na linha indicam diferença em relação ao Dia 1 ($P < 0,05$).

Na coluna ($P > 0,05$).

Tabela 3. Taxa de crescimento embrionário (Média \pm epm) durante o cultivo in vitro após a utilização de diferentes métodos de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing) na fertilização *in vitro* de bovinos.

Grupo	Cultivo in vitro - Taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$)						
	D1 - D2	D2 - D3	D3 - D4	D4 - D5	D5 - D6	D6 - D7	Geral (D1 - D7)
Percoll	0,6 \pm 1,3 ^A	0,4 \pm 1,1 ^A	-10,9 \pm 1,7 ^{A*}	6,1 \pm 1,3 ^{A*}	7,7 \pm 1,6 ^{A*}	14,7 \pm 2,0 ^{A*}	3,6 \pm 0,5 ^A
Swim-up	6,6 \pm 1,7 ^B	-3,3 \pm 1,4 ^{B*}	-12,4 \pm 1,7 ^{A*}	6,2 \pm 1,2 ^A	7,9 \pm 1,2 ^A	12,9 \pm 1,9 ^{A*}	2,8 \pm 0,4 ^A
Washing	3,6 \pm 1,8 ^{AB}	-2,9 \pm 1,6 ^{AB*}	-11,0 \pm 1,7 ^{A*}	7,1 \pm 1,5 ^A	8,4 \pm 1,5 ^{A*}	4,2 \pm 1,4 ^B	2,6 \pm 0,4 ^A

^{A,B} Letras diferentes dentro da coluna indicam significância estatística ($P < 0,05$).

* Na linha indicam diferença em relação ao intervalo D1 - D2 ($P < 0,05$).

Tabela 4. Análise da associação entre as categorias de †crescimento embrionário (nulo, moderado e rápido) e a porcentagem de produção de blastocistos durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos produzidos com diferentes métodos de seleção espermática.

Categoria de Crescimento	Blastocisto (%)	Odds ratio (95% I.C)	Valor de P
Nulo	9,5 (21/221)	2,4 (1,4 - 4,0)	0,0007
Moderado	20,4 (79/386)		
Nulo	9,5 (21/221)	48,4 (25,6 - 91,3)	0,0001
Rápido	83,5 (117/140)		
Moderado	20,4 (79/386)	19,7 (11,8 - 32,9)	0,0001
Rápido	83,5 (117/140)		

† Os embriões foram classificados de acordo com a taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) em nulo, moderado (0,1 a 7,0 $\mu\text{m}/\text{dia}$) e rápido ($> 7,1 \mu\text{m}/\text{dia}$).

I.C: 95% Intervalo de Confiança.

* Houve diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 5. Análise da associação entre o método de seleção espermática (Percoll, Swim-up e Washing) e a porcentagem de produção de blastocistos durante o cultivo in vitro.

Grupo	Blastocistos (%)	Odds ratio (95% I.C)	Valor de P
Percoll	34,6 (88/254)	1,4 (0,9 - 2,1)	0,0774
Swim-up	26,9 (66/245)		
Percoll	34,6 (88/254)	1,5 (1,0 - 2,2)	0,0308
Washing	25,4 (63/248)		
Swim-up	26,9 (66/245)	1,0 (0,7 - 1,6)	0,7754
Washing	25,4 (63/248)		

I.C: 95% Intervalo de Confiança.

* Houve diferença significativa ($P < 0,05$)