UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

EFEITOS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DO SEXO POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE NA QUALIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Letícia Zoccolaro Oliveira
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

EFEITOS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DO SEXO POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE NA QUALIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Letícia Zoccolaro Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro – 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Letícia Zoccolaro Oliveira nasceu na cidade de Piracicaba, em 6 de fevereiro de 1981. Em janeiro de 2005 apresentou o relatório de seu estágio supervisionado realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Gado de Leite, Valença -RJ), na Empresa de Genética e Reprodução Animal EMBRIAT (Rio Brilhante –MS) e na Empresa de Pesquisa Agropecuária do estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO, Niterói-RJ), todos com área de concentração em Reprodução Animal de Grande Porte para conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense-UFF. No período de março a novembro de 2005, realizou estágio no exterior na Michigan State University, no "Department of Animal Science", sob orientação do Professor Dr. Richard Pursley, onde desenvolveu atividades relacionadas a controle farmacológico do ciclo reprodutivo, inseminação artificial em tempo fixo, ultrassonografia reprodutiva, mapeamento ovariano e acompanhamento hormonal de vacas leiteiras. Em março de 2007, iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal.

EPÍGRAFE

“É melhor tentar e falhar, que ocupar-se em ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que nada fazer. Eu prefiro caminhar na chuva, do que em dias tristes, me esconder em casa. Prefiro ser feliz, que viver em conformidade”.

(Martin Luther King Jr.)

DEDICO

Ao meu pai Danilo Tostes Oliveira,

À minha mãe Inês Aparecida Zoccolaro,

A eles ofereço e dedico essa dissertação e toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por tudo e por todas as pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida.

Ao meus melhores amigos, meu pai Danilo, minha mãe Inês e minha irmã Larissa. Agradeço-lhes por cada dia, pelo que sou e por tudo o que eles são pra mim. Por serem meu alicerce, minha fortaleza, e meu espelho. Por me ensinarem valores dignos, princípios morais e ética. Pelos conselhos, por todo amor, carinho, dedicação, força e incentivo. Por me fazerem tão feliz.

Ao meu namorado Bruno, por esse amor genuíno e maravilhoso. Por ser meu companheiro, meu cúmplice e por estar sempre presente. Pelo apoio em todos os momentos e por todas as palavras de incentivo. Por ser meu amigo e o meu amor.

Aos meus avós paternos Job e Terezinha e aos meus avós maternos João e Maria, por todos os valores e ensinamentos passados. Por todas as palavras de sabedoria e conforto, e por serem exemplos de força e dignidade. Porque nossa família é maravilhosa.

Ao meu tio Ricardo e minha tia Gina, e minhas primas Natália e Júlia por todo o carinho e ajuda que sempre concederam a mim. Pelo incentivo e amizade. Porque, além dos maravilhosos momentos de conversa, me proporcionam carinho e alegria, e me fazem sentir que nunca estou longe de casa.

Ao meu primo, Marcelo Zoccolaro Costa, por todo o apoio, oportunidade e ensinamentos. Por ser meu exemplo profissional. Por ter sempre acreditado em mim, me passado seus conhecimentos, me incentivado a nunca desistir e me transformado em uma profissional muito melhor.

Aos meus tios e tias Nilceu, Denise, Delma, Décio, Soninha e Daniel, por toda a ajuda e carinho, sempre. Por tudo o que fizeram antes e durante o período da faculdade, durante o estágio nos EUA, durante o mestrado e agora no período das aulas em Uberlândia. Pelo incentivo, pela amizade e por serem um exemplo a ser seguido.

Ao meu padrinho Mário e a minha madrinha Sônia, pelo carinho e ajuda. Pelos bate papos, pelas risadas e pela atenção.

À minha sogra Rosy, meus cunhados Paulo e Lívia, e a todos seus familiares, por todos os momentos de alegria. Pela amizade, apoio, conselhos, hospitalidade, simpatia, incentivo e carinho.

Aos mestres:

Minha orientadora, Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, pela amizade, pelos conselhos, pela dedicação e simpatia. Pela oportunidade, pelos conhecimentos passados e confiança depositada. Por ter me ensinado a pesquisar e a trabalhar com responsabilidade, e ter permitido que esse sonho se realizasse.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, pela maravilhosa recepção a mim concedida na USP em Pirassununga. Pela orientação, pela amizade, e por todos os ensinamentos. Por que foi uma honra ter aprendido e trabalhado com sua equipe e em seu laboratório.

Ao meu sogro, Prof. Dr. Julio Carlos Canola, pelo afeto, respeito, e ajuda. Por ser um exemplo de profissional e ser humano, que mostra como exercer com ética, profissionalismo e humildade a profissão de Médico Veterinário.

Ao Prof. Dr. Elmo Gomes Diniz e a Profa. Dra. Ricarda Maria Santos pela ajuda e colaboração nessa nova etapa de minha vida.

À equipe indispensável para a realização deste experimento, à Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, ao Dr. André Furugen de Andrade e a MSc. Aline Costa de Lucio, por contribuírem diretamente para a realização desta pesquisa, com dicas, conceitos e ensinamentos fundamentais. Por terem me mostrado a importância do trabalho em equipe e terem se tornado bons amigos.

Aos membros da banca examinadora da qualificação: Prof. Dr. Cesar Roberto Esper e Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite e aos membros da banca examinadora da defesa desta dissertação: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, pela presença e sugestões a este trabalho. Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Dr. Cesar Roberto Esper, Dr. Francisco Guilherme Leite, Dr. Paulo Henrique Franceschini e Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pelos conselhos profissionais, pelas conversas e pelos ensinamentos que farão parte de mim pelo resto da minha vida profissional.

Aos amigos:

Às minhas queridas amigas de Jaboticabal, amigas para sempre e de todas as horas: Paulinha, Lídia, Anita, Paola, Clara, Carla Braga, Aracéle e Stael; às minhas queridas primas e amigas: Gabi, Tali, Juja e Robertinha; e às amigas de toda a vida: Dani, Fernanda e Rafa; agradeço todas vocês pela amizade, carinho e compreensão. Pelos maravilhosos, alegres e divertidíssimos momentos. Pela cumplicidade e companheirismo e por terem estado sempre ao meu lado.

Às recentes e queridas amigas Aline, Carol e Ana Paula, pelos conselhos, risadas e carinho. Pelas palavras amigas e pelas conversas. Pela ajuda, boa vontade e apoio incondicional, principalmente nesta última fase.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal: Danilas, Juliana Borges, Juliana Pieroni, Mabel, Michele, Maria Emília, Maricy, Max, Naiara, Roberta, Tati e Verônica, por todos os bons momentos que vivemos nestes anos de trabalho e ótima convivência.

Ao amigo Marcelo Bezerra pela ajuda, amizade e colaboração incondicional.

Ao amigo querido de todas as horas, Fabio Morato, pelos momentos divertidos e por todas as palavras sinceras de conforto e amizade.

Aos pós-graduandos da USP de Pirassununga, André, Carlinha, Lindsei, Zé Rodrigo, Fabian, Fabiane, André, Simone, Juliana, Patrícia e Fernando, que em pouco tempo se tornaram amigos queridos que carregarei sempre em meus pensamentos, não só por todos os conhecimentos passados a mim, mas pela convivência e simpatia.

Aos funcionários Ivo e Isabel pela amizade e carinho.

À Capes pelo auxílio financeiro e por tornar possível a realização deste trabalho.

À FCAV/UNESP-Jaboticabal. Pois conheci e convivi com pessoas tão maravilhosas, competentes e especiais dos quais eu jamais esquecerei e guardarei para sempre com boas recordações.

Faltam palavras para expressar a gratidão, mas muito obrigada mesmo a todos que colaboraram para mais essa conquista na minha vida.

SUMÁRIO

Pág

1. INTRODUÇÃO.....19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....21
2.1 Importância da seleção do sexo em mamíferos na produção animal e no melhoramento genético de rebanhos.....21
2.2. Rotas Tecnológicas para a seleção do sexo em animais de interesse zootécnico.....23
2.2.1. Diferenças nas proteínas de membrana dos espermatozóides.....24
2.2.2. Diferenças no conteúdo de DNA e na densidade.....25
2.2.2.1 Diferenças no conteúdo de DNA.....26
2.2.2.1.1 Sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo.....26
2.2.2.2 Diferenças de densidade.....30
2.2.2.2.1 Características do Percoll como substância formadora de gradiente.....32
2.2.2.2.2 Sexagem por centrifugação em gradiente de de Percoll™.....32
2.3. Avaliação do sêmen.....35
2.3.1. Análise convencional do sêmen.....35
2.3.2. Análise computadorizada do movimento espermático ("Computer Assisted Semen Analyses" - CASA).....37
2.3.3. Avaliação das Membranas Espermáticas por Sondas Fluorescentes...38
2.3.3.1. Avaliação da Membrana plasmática.....39
2.3.3.2. Avaliação da Membrana Acrossomal.....40
2.3.3.3. Avaliação da Membrana Mitocondrial.....42
2.3.3.4. Associação das Sondas fluorescentes.....43
3. HIPÓTESES.....45
4. OBJETIVOS.....46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....47
5.1. Local e Período Experimental.....47
5.2. Obtenção dos espermatozóides e delineamento experimental.....47

5.3. Preparação do gradiente de sexagem 49
5.3.1 Solução para gradiente de Percoll™.....49
5.3.2. Preparação do gradiente descontínuo de densidade 49
5.4. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides no gradiente de sexagem.....50
5.5. Avaliação das características espermáticas.....52
5.5.1. Concentração espermática.....52
5.5.2. Avaliação visual da motilidade e vigor.....53
5.5.3. Morfologia espermática…….....53
5.5.4. Avaliação pelo sistema CASA (Avaliação computadorizada sêmen).....53
5.5.5. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial pela associação das sondas fluorescente.....54
5.5.6. Taxa de Recuperação.....58
5.6. Análise estatística 59
6. RESULTADOS.....60
6.1. Avaliação visual da Motilidade e Vigor.....60
6.2. Avaliação das características morfológicas dos espermatozóides.....63
6.3. Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA).....66
6.4. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática, Acrossomal e Função Mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1....75
6.5. Avaliação da Taxa de Recuperação dos espermatozóides.....79
7. DISCUSSÃO.....81
7.1. Considerações Finais.....103
8. CONCLUSÕES……106
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……107
10. APÊNDICES.....128

LISTAS DE ABREVIATURAS

AcI - Células com Acrossoma Intacto

ALH - Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

ANOVA - Análise de variância

APM - Células com Alto Potencial Mitocondrial

ATP - Adenosinatrifosfato

BCF - Freqüência de batimentos flagelar

BSA - Albumina Sérica Bovina

CASA - Análise computadorizada do semên ("Computer-Assisted Semen Analisys")

CMXRos - cloreto de 8 -(4' -clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantilio (Mito Tracker Red®)

DMEM - "Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium"

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPBS/PBS - Solução Tamponada Salina de Dulbecco

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EP – Erro Padrão

FITC- Isotiocianato de flurosceína

FITC-PSA - Isotiocianato de flurosceína conjugado com aglutinina de *Pisum Sativum*

FIV - Fecundação *in vitro*

GLUT-3 - "Glucose transporter -3"

G6PD - glicose-6-fosfato-desidrogenase

HEPES - N(2-Hydroxethyl)piperazine –N`(ethanesulfonic acid)

Hsp - "heat shock protein"

Hz - Hertz

IA - Inseminação Artificial

JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LIN - Linearidade

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

MOTE - múltiplas ovulações e transferência de embriões

mOSm - miliosmol

MP - Motilidade progressiva

MPI - Células com Membrana Plasmática Intacta

mRNA - ácido ribonucléico mensageiro

MT - Motilidade total

nm - nanômetro

P - nível de significância

PH - concentração de íons de Hidrogênio

PI - Iodeto de Propídio

PIAIA - Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial

PIAIB - Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial

PIALA - Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial

PIALB - Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial

PLAIA - Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial

PLAIB - Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial

PLALA - Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial

PLALB - Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial

PIV - produção *in vitro*

PSA - aglutinina de *Pisum sativum*

SAS - “Statistical Analysis System” (Sistema de Análise estatística)

SE - Solução estoque

STR - Retilinearidade

TALP - ““Tyrode´s Albumin Lactate Pyruvate”

TR - Taxa de Recuperação

VAP - Velocidade sobre um trajeto uniforme

VCL - Velocidade curvilinear

VSL - Velocidade retilínea progressiva

xg - vezes a gravidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de variância para o delineamento com 2 tratamentos (controle e centrifugado) e 2 subespécies bovinas (Taurina e zebuína).....**59**

Tabela 2. Médias (± Erros Padrão) da motilidade espermática estimadas visualmente antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos)... **61**

Tabela 3. Médias (± Erros Padrão) do vigor espermático estimadas visualmente antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**62**

Tabela 4. Médias (± Erros Padrão) dos defeitos maiores da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**64**

Tabela 5. Médias (± Erros Padrão) dos defeitos menores da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**65**

Tabela 6. Médias (± Erros Padrão) do total de defeitos da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**65**

Tabela 7. Médias (± Erros Padrão) da Motilidade Total e Progressiva da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente

de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**67**

Tabela 8. Médias (± Erros Padrão) das velocidades de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**69**

Tabela 9. Médias (± Erros Padrão) do deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimentos (BCF) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**71**

Tabela 10. Médias (± Erros Padrão) de retilinearidade (STR) e de linearidade (LIN) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**73**

Tabela 11. Médias (± Erros Padrão) do percentual de células com movimento rápido (RAPID) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).....**74**

Tabela 12. Médias (± Erros Padrão) do percentual de espermatozóides apresentando Membrana Plasmática Intacta, Acrossoma Intacto e Função Mitocondrial, avaliados pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado).....**76**

Tabela 13. Médias (± Erros Padrão) das categorias de células avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 antes e após

centrifugação em gradiente de Percoll™, por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos). **79**

Tabela 14. Médias (± Erros Padrão) da taxa de recuperação dos espermatozóides centrifugados em gradiente descontínuo de Percoll™, separadas por subespécie animal (Taurinos e Zebuínos).....**80**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da metodologia da sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade.....**33**

Figura 2. Esquema do Delineamento experimental.....**48**

Figura 3. Confecção do gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.....**50**

Figura 4. Sequência da deposição do sêmen sobre o gradiente descontínuo de Percoll™. **A:** Retirada do sêmen descongelado. **B:** Descongelação do sêmen em Banho-Maria. **C:** Deposição do sêmen sobre os tubos contendo o gradiente de Percoll™. **D:** Tubo com o gradiente de Percoll™ e o sêmen pré-centrifugação.....**51**

Figura 5. A: Centrifugação em centrifuga refrigerada de rotor horizontal. **B:** Recuperação do gradiente sobrenadante após a centrifugação.....**52**

Figura 6. Aparelho Hamilton Thorne Biosciences – USP/Pirassununga.....**54**

Figura 7. Microscópio de Epifluorescência, Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i – USP/Pirassununga.....**56**

Figura 8. Esquema da classificação das células espermáticas de acordo com a sonda fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005). Adaptado de GONÇALVES, 2006.....**57**

Figura 9. Fotomicrografia de espermatozóides corados pela associação de corantes fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1. **A:** Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA). **B:** Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial (PLAIB). **C:** Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PLALB). USP -Pirassununga/SP…….....**58**

Figura 10. Médias da motilidade espermática estimada visualmente antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**61**

Figura 11. Médias do vigor espermático antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**63**

Figura 12. Médias das alterações morfológicas dos espermatozóides (Defeitos Maiores, Defeitos Menores e Defeitos Totais) antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**66**

Figura 13. Médias da Motilidade Total e Progressiva avaliadas pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**68**

Figura 14. Médias da velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) estimadas pelo sistema CASA antes (Controle) e

após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.....**70**

Figura 15. Médias do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH) estimado pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**72**

Figura 16. Médias da frequência de batimentos espermáticos (BCF) estimado pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**72**

Figura 17. Médias da Linearidade (LIN), Índice retilíneo do movimento espermático (STR) e das células com Velocidade Rápida (RAPID) estimadas pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.....**74**

Figura 18. Médias da Integridade da Membrana Plasmática, Acrossomal e Função Mitocondrial avaliadas pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 antes (Controle) e após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.....**77**

Figura 19. Médias de células com Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Integro e Alto Potencial Mitocondrial (PIAIA) e de células com Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Lesado e Alto Potencial Mitocondrial (PIALA) avaliadas pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes (Controle) e após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.....**78**

Figura 20. Taxa de recuperação dos espermatozóides após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™ nas subspécies Taurinas e Zebuínas.....**80**

EFEITOS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DO SEXO POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE NA QUALIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

RESUMO - Algumas avaliações da capacidade de fecundação como a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a coloração vital indicam que a sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade pode causar diminuição nas taxas de desenvolvimento embrionário, entretanto, não são conclusivas quanto à avaliação da integridade das membranas espermáticas. Com o intuito de obter dados mais precisos em relação à viabilidade espermática pós-sexagem, foram descongeladas doses de sêmen de 6 touros diferentes, e avaliadas quanto aos danos espermáticos causados pela centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll (com densidade variando de 1,111g/mL a 1,123g/mL). Antes e após a centrifugação dos espermatozóides, além das avaliações de concentração, motilidade e morfologia, o sêmen foi ainda avaliado quanto à integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio (PI), aglutinina de *Pisum Sativum* conjugado a Isotiocianato de flurosceína (FITC-PSA) e Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). Os resultados demonstraram que o processo de separação de espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade promoveu uma melhora nas características associadas à motilidade progressiva, além de uma significativa diminuição na incidência de defeitos maiores. Ainda nas amostras pós-centrifugação, foi observado um aumento no percentual de células com Membrana Plasmática Intacta e com Alto Potencial Mitocondrial. No entanto, o percentual de células com Membrana Acrossomal Intacta foi sensivelmente diminuída provavelmente devido ao fenômeno de reação acrossomal desencadeado pela centrifugação.

Palavras-chaves: CASA, gradiente de densidade, seleção do sexo, sêmen, sondas fluorescentes, viabilidade espermática

EFFECTS OF BOVINE X-BEARING SEPARATION BY CENTRIFUGATION IN DENSITY GRADIENT IN THE BOVINE SPERM QUALITY

SUMMARY - Some fecundity evaluations as the *in vitro* embryo production (IVP) and the vital stains have indicating that the density gradients centrifugation techniques can reduce the embryo development rates. However they are not conclusive for the integrity of spermatic membranes. Wit the purpose of obtain more precise sperm viability data after the sexing procedure, frozen semen samples from six different bulls were thawed and assessed for spermatic damage caused by centrifugation in discontinuous Percoll gradient (with density varying from 1,111g/mL to 1,123g/mL). Before and after the separation of X-bearing bovine sperm, were evaluated the sperm concentration, motility and morphology. Moreover the semen samples were assessed for integrity of plasma, acrosome and mitochondrial membranes by fluorescent probes association: propidium iodide (PI), fluorescein isothiocyanate–Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) and 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). The results demonstrated that the X-bearing sperm separation process by density gradient centrifugation caused an increase in the progressive motility parameters and a decrease in the major defects incidence. In addition, it was observed an increase in the cells categories with Intact Plasma Membrane and High Mitochondrial Membrane potential in the post-centrifugation samples. Nevertheless, the percentage of cells with Intact Acrossome Membrane was reduced probably due to the acrosome reaction phenomenon induced by centrifugation.

Key-Words: CASA, density gradient, sex selection, semen, fluorescent probes, sperm viability

1. INTRODUÇÃO

Em espécies de interesse zootécnico, os estudos e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo em espermatozóides intensificaram-se a partir da década de 1980. Este processo foi diretamente ligado ao aprimoramento e à difusão das técnicas de inseminação artificial (IA) e de transferência de embriões, dentro dos programas de melhoramento genético animal, que surgiram pela necessidade e demanda de sistemas de produção animal mais eficientes e modernos. Assim, desenvolveram-se as técnicas de seleção do sexo de espermatozóides e embriões em espécies de interesse zootécnico. Vários autores registraram o valor econômico significativo da seleção de sexo na pecuária de leite e de corte, atividades onde a produtividade é favorecida quando a progênie é constituída, em sua maioria, por um dos sexos (NICHOLAS & SMITH, 1983; TAYLOR et al., 1985; VAN VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992).

Nos mamíferos, a seleção do sexo vem sendo conseguida por separação dos espermatozóides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y, identificação do sexo de embriões pré-implantação e influência de fatores nutricionais e fisiológicos. Em várias espécies, existe uma significativa diferença na quantidade de DNA (ácido desoxirribonucleico) entre os cromossomos X e Y (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994), e desta forma, este parâmetro tem permitido separar essas duas populações de espermatozóides.

A técnica que se baseia na diferença do conteúdo de DNA para separação dos espermatozóides X e Y é a citometria de fluxo. Esta metodologia, na qual se utiliza um equipamento computadorizado e tecnologia à “laser”, é capaz de separar as duas populações de espermatozóides com acuidade acima de 90%. No entanto, embora a citometria de fluxo seja considerada, por alguns autores, a técnica mais promissora para sexagem de espermatozóides (devido à sua alta acuidade de separação), ela tem se demonstrado altamente dispendiosa e prejudicial à capacidade de fecundação dos espermatozóides (SEIDEL, 2003; TELFORD et al., 2003; CRAN, 2007).

Em bovinos, HOSSEPIAN de LIMA et al. (2003) desenvolveram um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de sílica coloidal modoficada (Percoll™). Utilizando-se metodologia bem mais simples e menos onerosa, a centrifugação em gradiente de densidade foi capaz de separar os espermatozóides X dos Y sem prejuízos aparentes à viabilidade espermática, apesar de uma acuidade menor (em torno de 70%) à obtida por citometria de fluxo. Quando utilizados para produção *in vitro* de embriões (PIV), foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% se desenvolveram até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN de LIMA, 2005). Além disso, essa técnica pode ser utilizada em sêmen descongelado, o que permite a utilização de touros provados nos programas de melhoramento que utilizam a PIV de embriões.

A aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides depende do estabelecimento de um método que além de ser compatível com o processo de congelação, minimize a perda de espermatozóides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos. O desenvolvimento e o aprimoramento desses métodos, bem como a sua introdução na tecnologia de sêmen ou de embriões exige abordagem minusciosa. Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acuidade de sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozóides após a centrifugação em gradiente de densidade.

Avanços na tecnologia de coloração celular têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER & JOHNSON, 1995; ARRUDA, 2000; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005). A integridade das estruturas espermáticas é monitorada pela combinação de probes fluorescentes (sondas fluorescentes), as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo a avaliação de diversas estruturas espermáticas, de acordo com suas características físicas. A combinação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (PI), Isotiocianato de flurosceína conjugado com aglutinina de *Pisum Sativum* (FITC-PSA) e Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), permite avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, respectivamente (CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2005; ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão de literatura desta dissertação, serão abordados os seguintes temas relacionados com o presente estudo: A importância da seleção do sexo em mamíferos na produção e no melhoramento genético de rebanhos; As rotas tecnológicas para a seleção do sexo em animais de interesse zootécnico, com ênfase nas técnicas baseadas nas diferenças no conteúdo de DNA e na densidade entre os espermatozóides portadores do cromossomo X e Y; e algumas das diferentes análises utilizadas para avaliação do sêmen.

2.1 Importância da seleção do sexo em mamíferos na produção e no melhoramento genético de rebanhos

Atualmente a pecuária passa por um processo de incorporação de técnicas, visando especialmente a melhoria dos índices de produtividade e a aceleração do melhoramento genético. Portanto, em animais de interesse zootécnico, o principal objetivo das biotécnicas da reprodução seria o de aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho (COSTA, 2002).

Desta forma, a seleção do sexo de espermatozóides ou de embriões visa aumentar o ganho genético anual (NICHOLAS & SMITH, 1983; VAN VLECK et al., 1987), uma vez que permitiriam o aumento do número de indivíduos de um dos sexos (masculino ou feminino) na progênie de uma população (BEKMAN et al., 1994).

No entanto, as técnicas de seleção do sexo de embriões não são utilizadas em larga escala. Isto se deve ao fato de que as metodologias de sexagem disponíveis para uso comercial requerem condições laboratoriais e técnicos especializados e reduzem os índices de gestação (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Foi demonstrado que o ganho genético aditivo anual depende, entre outros fatores, da intensidade de seleção e do intervalo de gerações. A intensidade de seleção é relativa a porcentagem de animais que serão selecionados dentro de uma população, e, quando existe desvio na proporção de sexos, aumenta-se a disponibilidade de

animais do determinado sexo para seleção, o que favorece o aumento do fator intensidade de seleção (VAN VLECK et al.,1987). Desta forma, o progresso genético poderá ser maximizado em programas de criação em que a proporção sexual é controlada por ocasião da IA, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (VAN VLECK et al., 1987; HOHENBOKEN, 1999; HABERMANN et al., 2005).

A possibilidade de produzir, em escala comercial, doses de sêmen enriquecido com espermatozóides X ou Y aumentará os benefícios da utilização da IA, conferindo-lhe papel relevante na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho. A importância dessa tecnologia é, portanto, maximizar a produção animal com menor custo possível (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

Dentre as vantagens oferecidas no uso da sexagem de espermatozóides em propriedades produtoras de leite, pode-se destacar o aumento da produtividade, uma vez que se aumenta o mérito genético para a característica economicamente importante (produção de leite) de uma forma eficiente. Ainda, pode-se salientar a diminuição do custo de produção de bezerros e a produção de bezerras de reposição geneticamente superiores (provenientes de acasalamentos programados) (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Avaliando sistemas de produção de leite, relatou-se que a utilização de teste de progênie e a utilização de touros provados como doadores de sêmen, promovem um ganho genético anual de 2,0 a 2,5%. Em um teste de progênie convencional, em que utilizasse sêmen enriquecido com cromossomo X para produzir acima de 70% de fêmeas, seria possível conseguir um aumento de 25% no ganho genético anual. Quando se utilizou, além dos programas de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE), doses de sêmen enriquecidas para a produção de novilhas (que seriam selecionadas para progenitoras da próxima geração de fêmeas), esse ganho atingiu até 30% (VAN VLECK, 1981).

Em sistema de produção de carne, uso de espermatozóides sexados assegura o nascimento de progênie masculina, o que é interessante no momento do abate, já que o macho possui peso 25% maior do que a fêmea aos 24 meses de idade (GORDON, 1994).

Assim, pode-se observar que a seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR et al., 1985; VAN VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992; HOHENBOKEN, 1999; HABERMANN et al., 2005). Entretanto, esses autores salientaram que os benefícios apenas serão observados se as técnicas de seleção do sexo não diminuírem a eficiência reprodutiva (por exemplo, taxas de prenhez inferiores a 60%). Neste contexto, de acordo com LUCIO (2007), utilizando-se um método de sexagem de espermatozóides que gere acuidade média de 60% e aproximadamente 70% de prenhez conseguiria-se uma maior intensidade de seleção e menor taxa de reposição, quando comparada com a metodologia em que se obtém 85% de acuidade com taxa de gestação de 21%.

O domínio da seleção do sexo de espermatozóides bovinos poderá beneficiar ainda a pesquisa na comunidade médica que, no último século, tem se dedicado ao desenvolvimento de técnicas para a seleção do sexo devido à necessidade de prevenção das doenças ligadas ao cromossomo X (ZARUTSKIE et al., 1989). Existem cerca de 500 anormalidades genéticas herdáveis ligadas ao cromossomo X, que são expressados por filhos que herdam o cromossomo X com genes anômalos da mãe portadora (FUGGER, 1999).

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

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

Duas rotas tecnológicas são percorridas na tentativa de selecionar-se o sexo em mamíferos, principalmente nas espécies de interesse zootécnico: seleção do sexo em espermatozóides e identificação do sexo em embriões pré-implantação. Nesta

dissertação, abordaremos apenas as principais rotas tecnológicas relacionadas à seleção do sexo de espermatozóides.

2.2.1. Diferenças nas proteínas de membrana dos espermatozóides

As técnicas relacionadas a essa teoria baseiam-se principalmente, na detecção de antígenos de membrana específicos dos espermatozóides X ou Y. Em 1971, GOLDEBERG et al., verificaram a expressão do antígeno H-Y na membrana dos espermatozóides de camundongos. Este é um antígeno restrito ao sexo masculino, uma vez que é espressado por genes específicos do cromossomo Y. BENNET & BOYSE (1973) demonstraram que o tratamento do sêmen de camundongos com anticorpos anti H-Y e complemento, antes da IA, proporcionou um desvio pequeno, mas significativo, na proporção sexual, em favor das fêmeas desta espécie (45,5% de machos, em comparação com 53,4% do grupo controle). HOPPE & KOO (1984) não verificaram desvio na proporção sexual quando utilizaram em fecundação *in vitro* (FIV) espermatozóides submetidos a este tratamento.

Existe, no entanto, a possibilidade de espermatozóides X reterem na sua membrana o antígeno H-Y oriundos de espermatogônia H-Y positiva. Esta possibilidade foi aventada por alguns autores para explicar as dificuldades da sexagem de espermatozóides de coelho e bovino por métodos imunológicos (BENNET & BOYSE, 1973; OHNO & WACHTEL, 1978; HOPPE & KOO, 1984). Além disso, parece existir uma possível troca de mRNA pelas pontes citoplasmáticas entre as espermátides X e Y (ERICKSSON et al., 1981).

Atualmente existem várias publicações e patentes que sugerem a sexagem de espermatozóides por métodos imunológicos, mas os resultados não são conclusivos e deixam em aberto a possibilidade de espermatozóides X e Y diferirem quantitativa e qualitativamente em relação a alguns produtos gênicos (revisto por HENDRIKSEN, 1999).

BLECHER (1998) registrou em patente a identificação das moléculas sexo específicas relatadas no seu trabalho de 1998, descrevendo as possíveis utilizações práticas de sua descoberta, relatando o desenvolvimento de um método para a

sexagem imunológica dos espermatozóides pela identificação de proteínas específicas do sexo. O método baseia-se na identificação e isolamento dessas proteínas, na sua purificação por cromatografia de coluna e na obtenção de anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino e do sexo feminino. Após a incubação com espermatozóides bovinos, os anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino promoveram a aglutinação de 50% dos espermatozóides e as células que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 92% de embriões do sexo masculino. Não foi relatado se a incubação dos espermatozóides com anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino, desviou a proporção sexual em favor do sexo feminino.

A mais recente patente publicada por BENJAMIN et al. (2000) descreve o uso de contas magnéticas não porosas ligadas a anticorpos sexo específicos. A separação se dá pela adição ao sêmen de anticorpos específicos para um dos sexos, previamente acoplados às contas. Os espermatozóides tratados são submetidos a um campo magnético e o sobrenadante removido constitui a fração rica em espermatozóides X ou Y (BENJAMIN et al., 2000). Apesar da técnica descrita nesta patente ser de conhecimento amplo na imunologia e, portanto, consagrada pela eficiência, o autor não relatou o uso dos espermatozóides separados em IA ou qualquer outra técnica que comprovasse a separação dos espermatozóides (LUCIO, 2007).

No que se refere à utilização prática da seleção do sexo por métodos imunológicos, permanece a limitação da necessidade de mais investigações, utilizando técnicas de identificação de proteínas mais sensíveis, a fim de se produzir um anticorpo específico do espermatozóide X ou Y (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

2.2.2. Diferenças no conteúdo de DNA e na densidade

A identificação microscópica dos cromossomos sexuais (X e Y) em 1910 foi um marco no campo das pesquisas objetivando a sexagem de espermatozóides, pois geraram a idéia de que o sexo poderia ser controlado por estas estruturas especializadas (SEIDEL Jr. & GARNER, 2002). Além disso, descobriu-se que a quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y variava significativamente entre as espécies (JOHNSON & WELCH, 1999). Esta diferença do conteúdo de DNA entre os

espermatozóides X e Y foi constatada em pelo menos 23 espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON, 1994) e, em bovinos, a diferença é de 3,8% em média. Ainda, além da existência de maior conteúdo de DNA nos espermatozóides X em relação aos espermatozóides Y, a análise da cabeça dos espermatozóides demonstrou, por microinterferometria, que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células, resultando em uma diferença de densidade de pelo menos $7x10^{-4}$ g/cm^3 ou 0,06% (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999).

Nessa diferença do conteúdo de DNA e da densidade é que se baseiam as duas principais técnicas utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozóides *in vitro*: a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade.

2.2.2.1. Diferenças no conteúdo de DNA

Entre as espécies, a menor diferença encontrada entre a quantidade de DNA do cromossomo X em relação ao Y é de 2,8% na espécie humana e a maior é de 12,5% no *Microtus oregoni* (JOHNSON & CLARKE, 1990; JOHNSON, 1994). Nos animais domésticos, as diferenças de DNA entre os espermatozóides X ou Y variam de 3,5% a 4,2%, e nos bovinos é de proximadamente 3,8% (JOHNSON, 1992, 1994). Nesta espécie, observou-se uma diferença média significativa do conteúdo de DNA dos espermatozóides X ou Y entre as subespécies, com maior diferença encontrada nas raças taurinas em relação às raças zebuínas, fato este relacionado ao tamanho do cromossomo Y (GARNER et al., 1983). Entre raças também se encontrou diferença significativa, mas não entre os indivíduos da mesma raça. Na raça Brahman foi encontrada a menor diferença (3,73%) entre os espermatozóides X ou Y. Em touros Jersey observou-se a maior diferença (4,24%) quando comparada com as raças Angus (4,05%), Hereford (4,03%) e Holandês (3,98%) (GARNER et al., 1983; JOHNSON & WELCH, 1999).

2.2.2.1.1. Sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo

A separação de espermatozóides X ou Y pela técnica de citometria de fluxo, se baseia na diferença do conteúdo de DNA entre eles e somente foi conseguida a partir de 1987 (JOHNSON et al.). Nesta técnica, o ejaculado é diluído em meio de cultura e um corante fluorescente para DNA (Hoescht 33342) é adicionado. Os espermatozóides então são incubados à 32℃ por aproximadamente uma hora. Este corante liga-se a dupla hélice em quantidade proporcional à quantidade de DNA que vai evidenciar as diferenças de conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y. No citômetro de fluxo os espermatozóides corados passam em fila única através de um feixe de “laser” que emite luz ultravioleta. Os sinais fluorescentes emitidos pelo núcleo dos espermatozóides são colhidos simultaneamente, por detectores ópticos posicionados a 0° e 90° em relação a face plana e extremidades da cabeça espermática, respectivamente. Os detectores convertem estes sinais para sinais eletrônicos, e em seguida, o feixe de espermatozóides é quebrado em gotas pequenas e uniformes por um transdutor. As gotas contendo um espermatozóide X ou Y são carregadas com carga positiva ou negativa, respectivamente, de acordo com a intensidade de fluorescência. As gotas passam por um campo eletrostático e são separadas em dois tubos distintos. As gotas vazias e aquelas que não estão dentro dos padrões de fluorescência estabelecidos continuam no feixe central e caem em um tubo de descarte. Desta forma, o citômetro de fluxo separa os espermatozóides de acordo com a intensidade de fluorescência em tubos contendo meio de cultura (JOHNSON, 1992, 1994).

Esta técnica de sexagem de espermatozóides, que é a utilizada comercialmente, apresenta acuidade de separação de espermatozóides X e Y de 90% (CRAN, 2007). Apesar dos bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento, uma vez que este apresenta alto custo de aquisição (em torno de U$ 350.000,00), manutenção e manipulação. Ademais, a licença para a utilização da sexagem por citometria de fluxo, é detida por poucas empresas que controlam e restringem a sua utilização comercial ou científica. Além disso, a baixa produção/equipamento/hora (CRAN, 2007), permite que seja produzido um pequeno número de doses de sêmen enriquecidas com espermatozóides X ou Y por dia (aproximadamente 8 doses/hora) (GARNER & SEIDEL,

2008). Esta baixa produção não é capaz de suprir a demanda atual de sêmen sexado, restringindo sua utilização na indústria da IA. Entre os outros fatores que limitam a utilização da técnica de citometria de fluxo pode-se destacar:

a) o baixo número de espermatozóides sexados: as doses produzidas para inseminação contém apenas cerca de 2 milhões de espermatozóides totais/dose (SEIDEL, 2007), valor este bem inferior ao comparado com as doses convencionais utilizadas em programas de IA que possuem concentrações de pelo menos $15x10^6$ espermatozóides (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

b) a necessidade de utilizar sêmen *in natura*: o processo de congelação dos espermatozóides prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos com o Hoescht 33342, diminuindo a eficiência de sexagem nos espermatozóides descongelados (JOHNSON, 1994). Assim, restringe-se a utilização de alguns dos melhores touros (touros provados), dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a PIV de embriões. Este quadro é agravado pelo fato de que o sêmen de alguns touros não resiste ao processo de sexagem por essa técnica ou produzem altas variações na taxa de clivagem (34 a 65%) e de blastocistos produzidos (14 a 25%) (ZHANG et al., 2003);

c) diminuições nas características relativas à fertilidade avaliadas *in vivo* e *in vitro*: MORTON et al. (2007), ao investigarem a expressão padrão do mRNA e avaliar os danos causados na expressão gênica de embriões PIV utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo, verificaram que estes apresentavam transcrição alterada de alguns genes importantes no desenvolvimento dos embriões (como os genes Glut-3, G6PD, XIST, e Hsp 70.1), comparado a embriões em que não se utilizou espermatozóides sexados. Os autores concluíram que houve uma redução nas taxas de clivagem e blastocistos, quando se utilizou sêmen sexado. Desta forma, eles puderam concluir que o sêmen sexado por citometria de fluxo retarda o desenvolvimento embrionário, devido a danos no mRNA.

Apesar dos tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo aparentemente não impedirem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto (SPINACI et al., 2005), LIBBUS et al. (1987) observaram danos cromossômicos em 50% dos espermatozóides de *Microtus oregoni*, após a sexagem por esse método. Ainda na PIV

de embriões, com a utilização de sêmen sexado sem submetê-los a congelação, de acordo com GUTHRIE et al. (2002) obtém-se 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento de blastocistos.

Outros exemplos da diminuição nos parâmetros de fertilidade foram observados em testes *in vivo.* Em um estudo recente realizado na Suíça, espermatozóides sexados por citometria de fluxo e espermatozóides não sexados (dois milhões/dose) foram depositados no corpo do útero de novilhas e vacas. A taxa média de prenhez com espermatozóides sexados foi de 29,6% e 23,8%, enquanto utilizando espermatozóides não sexados as taxas foram 59,3% e 26,6% para novilhas (P=0,05) e vacas (P>0,05), respectivamente (BODMER et al., 2005). Neste mesmo estudo foi constatada uma maior perda embrionária comparada com o controle, quando se utilizaram espermatozóides sexados por citometria, alcançando índice de 11,1% em novilhas e 17,2% em vacas, e em contraste, utilizando-se espermatozóides não sexados, o índice foi de apenas 5,6% em vacas e de 0% em novilhas. No entanto não foi observada diferença significativa (P>0,05) entre estes valores para sêmen sexado e não sexado (BODMER et al., 2005).

Nos Estados Unidos, resultados de um teste de campo compararam as taxas de prenhez, conseguidas com espermatozóides sexados por citometria de fluxo, em rebanhos com baixa, média e alta eficiência reprodutiva. A taxa média de prenhez com doses de sêmen convencional foi de 58%, e utilizando sêmen com espermatozóides sexados as taxas de gestação foram 21, 37, e 35%, respectivamente (WEIGEL, 2004). Em outro teste de campo na Finlândia, também foram comparadas as taxas de prenhez oriundas de inseminações com espermatozóides sexados por citometria de fluxo (foram utilizadas 157 doses) e com sêmen convencional (foram utilizadas 149 doses). A taxa média de prenhez com doses de sêmen convencional foi de 46%, enquanto utilizando sêmen sexado foi de 21%. Assim, nasceram mais bezerras após a IA com sêmen convencional (33 bezerras) do que como sêmen sexado (27 bezerras) (ANDERSSON et al., 2006).

Considerando estes e outros resultados avaliados *in vivo* e *in vitro* (LU et al., 1999; SEIDEL & GARNER, 2002; LU & SEIDEL, 2003; WILSON et al., 2005; WHEELER et al., 2006; SEIDEL, 2007; PALMA et al., 2008; PEIPPO et al., 2008) torna-se evidente

que os espermatozóides sexados por citometria de fluxo comprometem a taxa de gestação, pelo menos atualmente, e estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen deveriam ter como foco caminhos para se obter benefícios efetivos, frente aos custos de utilização (WEIGEL, 2004).

Por outro lado, a literatura denota, em bovinos, que alguns resultados de fertilidade a campo utilizando os espermatozóides sexados por este método, apresentaram índices similares comparados à utilização de espermatozóides não sexados. No entanto, estes resultados foram obtidos em condições experimentais estritamente controladas (IA no corno uterino) necessitando de técnicos especializados para sua realização (SEIDEL et al., 1997, 1999) ou utilizando somente novilhas (DUARTE et al., 2007). De acordo com a empresa especializada na comercialização desse sêmen, observam-se ainda outras recomendações para o uso de sêmen sexado pela citometria de fluxo, como a utilização apenas em fêmeas com histórico reprodutivo excelente, em rebanhos que tenham manejo nutricional e sanitário adequados e, não ser utilizado em programas de inseminação artificial em tempo fixo (recomendações impressas no protocolo de utilização de sêmen sexado da empresa especializada).

Assim, fica difícil concluir como seriam os resultados em países que possuem uma pecuária caracterizada por heterogeneidade de condições de manejo. Neste sentido, considera-se que para a realidade brasileira, é mais interessante optar-se por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem entre 65 a 75%, mas que permita alcançar índices de fertilidade satisfatórios em condições variadas, ou seja, obter índices de fertilidade acima de 60% e com aumento no custo de produção que não ultrapasse àquele ótimo determinado pelos modelos matemáticos de simulação (HOHENBOKEN, 1999).

No que diz respeito a sexagem por citometria de fluxo, a baixa taxa de gestação, associada ao pequeno número de células separadas por hora, tem dificultado a aplicação comercial desta técnica e incentivam a investigação de outra diferença fenotípica entre os espermatozóides X e Y (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

2.2.2.2. Diferenças na densidade

Os métodos que se baseiam na diferença de densidade entre as duas populações de espermatozóides envolvem processos de centrifugação. Como relatado anteriormente, existe uma maior quantidade de DNA e proteína nuclear na cabeça dos espermatozóides X em relação aos espermatozóides Y (demonstrado por microinterferometria), e esta diferença é proporcional à densidade entre os dois tipos de células. A diferença de densidade entre o X e o Y é de 0,06% (0,0007g/cm³) (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999), o que determina uma velocidade diferencial de sedimentação. Portanto, partindo do princípio de que os espermatozóides portadores do cromossomo X são mais pesados do que os espermatozóides portadores do cromossomo Y, este processo consiste basicamente na centrifugação do sêmen obtendo-se maior proporção de espermatozóides X no sedimento final. É necessário, no entanto, que sejam utizados para a sexagem, gradientes de alto nível de resolução de densidade, pois a água e os lipídeos contidos na cabeça dos espermatozóides podem mascarar essa diferença de densidade entre X e Y (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

Na tentativa de separação dos espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade, em diversas espécies, utilizou-se Albumina sérica, Ficoll, Ficoll-Metrizoato de Sódio e Percoll™ (SHASTRY et al., 1977; KANEKO et al., 1983; AMANN, 1989; BLOTTNER et al.,1993; HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; ROSE et al., 1998).

HOSSEPIAN DE LIMA (1998), estudando a separação de espermatozóides X ou Y, por meio de sedimentação em diferentes gradientes de Percoll™, obteve para oito e doze gradientes diferentes respectivamente 74,45% e 74,55%, de espermatozóides bovinos portadores do cromossomo X. KOBAYASHI et al. (2004), utilizando gradiente descontínuo de Sílica Coloidal Modificada (Percoll™) com oito camadas, relataram o desvio na proporção das duas populações de espermatozóides bovinos, obtendo aproximadamente 80% de espermatozóides X no sedimento.

Na espécie humana, os métodos de centrifugação em gradiente de densidade com Percoll™, tanto para sexagem, como para separação de espermatozóides viáveis para procedimentos como IA e PIV, apesar de apresentar resultados satisfatórios (permitindo um alto nível de resolução), tiveram seu uso clínico suspenso. Isto se deveu ao fato de que o Percoll™ ocasionou o aparecimento de endometrite em mulheres

inseminadas com sêmen previamente centrifugado em gradiente de densidade composto por meios coloidais, cuja composição continha sílica (MAKKAR et al., 1999).

Foram desenvolvidos gradientes de densidade com Ioxididanol e demonstrado que, em vacas, não houve comprometimento da fertilidade (taxa de prenhez de 80%) após inseminação com espermatozóides centrifugados neste gradiente, deste modo, podendo substituir o Percoll™ (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

HOSSEPIAN de LIMA et al. (2000) e HOSSEPIAN de LIMA (2005), obtiveram resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual utilizando tanto o Percoll™ como o Ioxididanol. No entanto, estudos posteriores do Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP-Jaboticabal (LUCIO, 2007 e RESENDE, 2007) demonstraram que o Percoll™ como substância formadora de gradiente de densidade, apresentou vantagens em relação ao Ioxididanol quanto à repetibilidade da técnica. Foi demonstrado ainda que fêmeas bovinas não tiveram sua fertilidade comprometida após inseminação com espermatozóides tratados com Percoll™ (HOSSEPIAN de LIMA et al., 2003).

2.2.2.2.1 Características do Percoll™ como substância formadora de gradiente

O Percoll™ é um meio bem referenciado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares. A solução estéril é composta por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona. Com o Percoll™ é possível a formação de gradientes com densidade de até 1,130g/mL, com osmolaridade menor que 300 mOSm/kg H_2O. Para isso, é necessário preparar uma solução estoque contendo nove partes de Percoll™ e uma parte de solução com 1,5M de NaCl ou 2,5M de sacarose (VICENT & NADEAU, 1984).

2.2.2.2.2. Sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de Percoll™

Existem dois tipos de gradientes de densidade (DENSITY GRADIENT MEDIA, 2003):

a) gradientes contínuos de densidade, em que há um aumento gradual da densidade da parte superior do gradiente até a parte inferior, não havendo delimitação entre as camadas formadas previamente, formando um gradiente linear;

b) gradientes descontínuos de densidade, em que também há aumento gradual da densidade da parte superior para a inferior, contudo este tipo possui camadas definidas, ficando a camada mais densa na parte inferior do tubo, diminuindo-se nas partes superiores do tubo.

O gradiente descontínuo de densidade é preparado depositando-se as camadas de diferentes densidades, em tubos cônicos. As amostras de sêmen são então depositadas sobre o gradiente e centrifugadas. Os sobrenadantes dos tubos são retirados e os sedimentos de espermatozóides recuperados (Figura 1). Para a formação do gradiente contínuo, há necessidade de se montar um gradiente descontínuo de três a quatro camadas, inicialmente, e depois promover procedimentos específicos que levarão a difusão destas camadas (RESENDE, 2007).

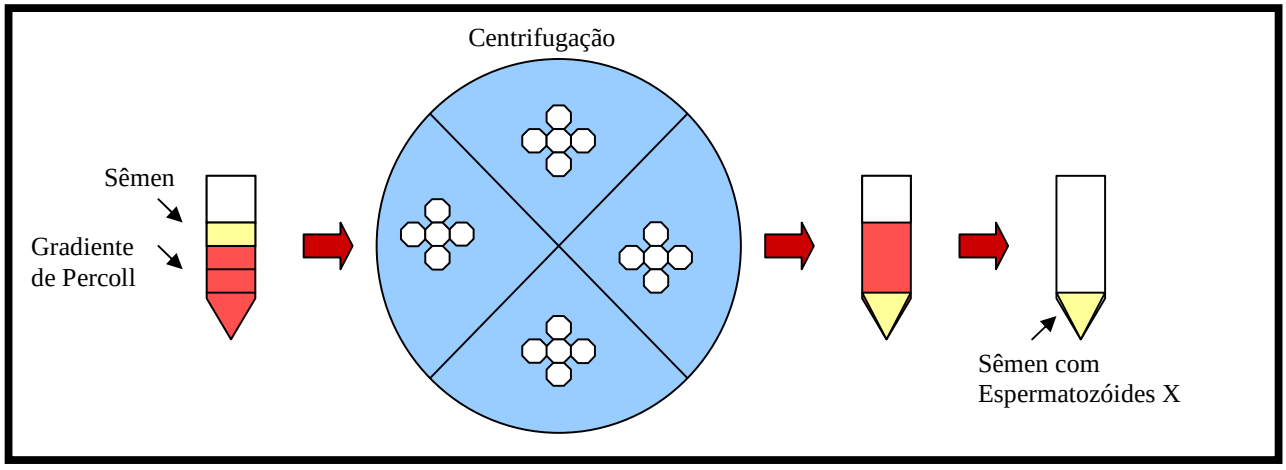


Figura 1. Esquema da metodologia da sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade.

Em bovinos, HOSSEPIAN de LIMA (1998, 2005) desenvolveu um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll™, obtendo acuidade de sexagem de sêmen *in natura* de cerca de 73%. Quando utilizados para a PIV de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30%

desenvolveram-se até o estágio de blastocisto. Apesar de menor acuidade de sexagem do que a obtida por citometria de fluxo, o sêmen *in natura* processado para sexagem por centrifugação em gradiente de densidade pode ser utilizado em IA, contribuindo efetivamente para o melhoramento genético animal, visto que este procedimento não altera a eficiência reprodutiva do rebanho (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

Utilizando doses de sêmen descongelado para posterior sexagem por centrifugação em gradientes descontínuo de Percoll™, LUCIO (2007) e PERINI (2007) obtiveram menor acuidade na separação dos espermatozóides X (de 60% a 65%). Nesses dois estudos as taxas de clivagem e blastocistos ficaram em torno de 70% e 32%, respectivamente. Resultados semelhantes foram demonstrados por RESENDE (2007), que também utilizou doses congeladas de sêmen, e obteve, após descongelação e sexagem por centrifugação em gradiente contínuo de Percoll™, 62% de acuidade de sexagem, 69% na taxa de clivagem e 21% na taxa de blastocistos.

Este método de seleção do sexo de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade apresenta algumas vantagens em relação àquele oferecido ao mercado, até o momento, como a necessidade de um investimento bem menor em relação ao equipamento. Além disso, elimina-se a dependência externa e dispendiosa referente ao licenciamento para utilização de patente, podendo ainda, produzir mais doses de sêmen enriquecido do que o citômetro de fluxo, em um mesmo período de tempo (utilizando sêmen *in natura*, com centrífuga para quarenta tubos, por exemplo, pode-se produzir 16 doses com $20x10^6$ espermatozóides/hora). Desta forma, o custo de produção da palheta contendo sêmen sexado é significativamente reduzido (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

Apesar das vantagens do método de centrifugação em gradiente de densidade, é importante considerar que a aplicação da seleção do sexo de espermatozóides beneficiará sistemas específicos de melhoramento e produção animal. Neste contexto é importante considerar os estudos que demonstram que o impacto de qualquer tecnologia depende de quão amplamente e eficientemente possa ser implementada (TELFORD et al., 2003). Assim, entende-se que o aprimoramento do método de centrifugação em gradientes de densidade, principalmente no que se refere à acuidade

e à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides em bovinos (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

2.3. Avaliação do sêmen

Segundo LOPEZ et al. (1999), a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen pode ser usada para verificação da fertilidade do sêmen ou do reprodutor, servindo não apenas para pesquisa da fisiologia espermática, mas também para programas de IA.

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais para predizer com acurácia a capacidade fertilizante do sêmen há muitos anos instiga os pesquisadores (CELEGHINI, 2005). No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas residem nos diferentes atributos que o espermatozóide deve possuir para fertilizar o oócito. Até o momento, infelizmente não se desenvolveu nenhum teste laboratorial que isoladamente fosse capaz de estimar o potencial de fertilidade do sêmen (ARRUDA et al., 2007), devido à complexidade do espermatozóide, do mecanismo de fecundação (OURA & TOSHIMORI, 1990) e dos fatores que levam ao sucesso do desenvolvimento embrionário (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001).

Por esta razão é necessário associar testes de fertilidade espermática, a fim de melhorar a acurácia de predição do real potencial reprodutivo do sêmen (AMANN et al.,1993; JANUSKAUSKAS et al., 2001; ARRUDA, 2003; BRITO et al., 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004; GADEA, 2005; CELEGHINI, 2005; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2006 e RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2007). Critérios mais sensíveis de aferição da motilidade e/ou de lesões das membranas espermáticas têm sido propostos como avaliações finais complementares nas monitorações dos procedimentos realizados com o sêmen. O desenvolvimento de técnicas computadorizadas e as variedades de fluorocromos forneceram novas ferramentas de acesso à funcionalidade dos espermatozóides (YOSHIDA, 2000).

2.3.1. Análise convencional do sêmen

A motilidade espermática é uma avaliação importante da função do espermatozóide, sendo um aspecto a ser considerado na análise da qualidade do sêmen (FONSECA et al., 1992). O método clássico de acessar a viabilidade dos espermatozóides é determinando a porcentagem de células com motilidade progressiva usando a microscopia óptica. No entanto, apesar de ser uma forma prática e simples de avaliar indiretamente a atividade metabólica, este método mostra grande subjetividade e variabilidade nos resultados (GARNER et al., 1997; MALMGREN, 1997).

As análises padrão da avaliação seminal como indicadores da fertilidade do macho incluem ainda o vigor espermático, determinado visualmente de acordo com a intensidade em que os espermatozóides se movimentam, a concentração espermática, estimada com auxílio da câmara de Neubauer, e a avaliação morfológica, na qual o percentual de defeitos classificados como maiores ou menores são avaliados microscopicamente.

De acordo com BARBOSA (2005), a classificação em defeitos maiores e defeitos menores segue o protocolo descrito por BLOM (1973), ou seja:

a) Defeitos maiores: defeito no acrossoma, gota citoplasmática proximal, cabeça subdesenvolvida, cabeça estreita na base, cabeça isolada patológica, cabeça pequena anormal, contorno anormal, “pouch formation”, cauda enrolada na cabeça, cabeça piriforme, formas teratológicas, defeitos da peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota distal.

b) Defeitos menores: cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal, cauda abaxial, retroaxial ou oblíqua, cauda dobrada ou enrolada, gota citoplasmática distal.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o aumento na porcentagem de espermatozóides anormais no ejaculado correlaciona-se negativamente com a fertilidade (GRAHAM, 1996; VERSTEGEN et al., 2002). De acordo com BARBOSA et al. (2005), na interpretação da morfologia espermática de touros, deve-se considerar para defeitos maiores o limite de 20%, e para os defeitos menores, limite de 25%. Para o total de defeitos, ou seja, para a soma de defeitos maiores e de defeitos menores, o limite é de 30%.

2.3.2. Análise computadorizada do movimento espermático – ("Computer Assisted Semen Analyses" - CASA)

Nas últimas décadas, diversos sistemas de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de aumentar a acurácia da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia (TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002; AMANN & KATZ, 2004).

CASA refere-se a um sistema automatizado ("hardware e software") que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos espermatozóides móveis. Estes são posteriormente identificados em imagens que são analisadas e, desta forma, obtêm-se o estabelecimento de sua trajetória, fornecendo informações precisas e significativas da cinética das células (FARREL et al.,1998). Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatóizoides é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides (FARREL et al., 1998; ARRUDA et al., 2007). Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com migração trans-membrana (HONG et al.,1991), penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de FIV (CENTOLA, 1996; HOLT et al., 1997 e JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Apesar do seu alto custo, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez e objetividade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado, fornecendo assim, informações e detalhes adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozóides (FARREL et al.,1998; SOUSA, 2007). Outra vantagem é que a repetibilidade existente entre as análises e equipamentos permite, uma vez que se tenha realizado padronização do "setup" (RIJSSELAERE et al., 2003), a comparação dos resultados apresentados por diferentes laboratórios, servindo de base para o intercâmbio tecnológico (FARREL et al.,1998).

De modo geral, os parâmetros da cinética espermática avaliados pelo sistema CASA (ARRUDA, 2000; SOUSA, 2007) são:

- Motilidade total (MT) - É a razão das células móveis no total de espermatozóides da amostra (%).
- Motilidade progressiva (MP) - É a razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozóides da amostra (%).
- Velocidade sobre um trajeto uniforme (VAP)- É a indicação da trajetória geral do espermatozóide, sendo a velocidade média ininterrupta do caminho da célula (μm/s).
- Velocidade retilínea progressiva (VSL) - Considera a trajetória espermática como uma reta. É a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso (μm/s).
- Velocidade curvilinear (VCL) - É a velocidade do deslocamento real dos espermatozóides, ou seja, é a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula (μm/s).
- Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH)- Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozóide durante seu deslocamento (μm).
- Freqüência de batimento (BCF) – Visa fornecer indicações da freqüência do batimento. É definida como a frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido (Hz).
- Retilinearidade (STR) - É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (uma comparação da linha reta com a média dos caminhos) (%).
- Linearidade (LIN) - É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (comparação da linha reta e os caminhos curvilíneos) (%).

De acordo com ARRUDA (2000), para os parâmetros motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL, BCF, STR, LIN e RAPID, quanto maior for o valor numérico obtido, melhor deverá ser a qualidade espermática, e, opostamente, para o parâmetro ALH, quanto maior valor numérico obtido, pior a qualidade espermática.

2.3.3. Avaliação das Membranas Espermáticas por Sondas Fluorescentes

Os espermatozóides são constituídos por vários compartimentos inclusos dentro das membranas plasmática e mitocondrial. Essas membranas devem permanecer intactas e funcionais para permitir a competência celular, sendo essenciais à proteção, ao funcionamento celular e ao processo de fertilização (SOUSA, 2007).

Avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER & JOHNSON, 1995; ARRUDA, 2000; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005). A funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes (ou fluorocromos), as quais possuem a capacidade de se ligar e marcar estruturas específicas das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, dependendo de suas características físicas (CELEGHINI, 2005).

Apesar do alto custo, elas podem fornecer informações precisas sobre os compartimentos e estado funcional dos espermatozóides, uma vez que a fluorescência é um indicador sensível do estado de certas moléculas, sendo aplicado como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (CELEGHINI, 2005).

Uma variedade de sondas tem sido utilizada na avaliação dos diferentes componentes celulares e a maioria dos testes, que foram desenvolvidos nos últimos anos com esse objetivo, permitem analisar diferentes aspectos da função espermática como a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997, ARRUDA, 2000; CELEGHINI et al., 2007).

2.3.3.1. Avaliação da Membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da viabilidade espermática (PAPAIOANNOU et al., 1997), por ser responsável pelo mecanismo de manutenção de equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira seletiva entre os meios intra e extracelular. Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular e, *in vivo,* um espermatozóide com a membrana plasmática afuncional torna-se incapaz de realizar a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006).

A integridade dessa estrutura é usualmente verificada por corantes fluorescentes específicos para DNA que são impermeáveis às membranas intactas. Portanto, são coradas apenas células com membrana plasmática lesada, podendo ser consideradas vivas as células que são capazes de excluir essas sondas. De acordo com ARRUDA et al. (2007), várias sondas com esse princípio têm sido testadas nos espermatozóides. Como exemplo, o brometo de etídio (HALANGK et al., 1984); corantes supravitais Hoechst 33258 e Hoechst 33342 (CASEY et al., 1993; MAXWELL et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2001); SYBR-14 (GARNER et al., 1999; THOMAS et al., 1998); diacetato de carboxifluoresceína (HARRISON & VICKERS, 1990; PEÑA et al., 1998; SOUZA, 2001; VALCÁRCEL et al., 1994); e iodeto de propídio (PI) (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; CELEGHINI, 2005; apud ARRUDA, 2007).

Por ser um corante muito estável, o PI tem apresentado êxito nos resultados tanto com o sistema de citometria de fluxo para contagem de células quanto em microscopia de epifluorescência (CELEGHINI, 2005), corando em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada devido à sua afinidade ao DNA (PAPAIOANNOU et al., 1997).

Além disso, esta sonda vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de aplicação da técnica e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática (ARRUDA et al., 2007).

2.3.3.2. Avaliação da Membrana Acrossomal

O acrossomo é uma grande organela preenchida com enzimas hidrolíticas. A ligação inicial do espermatozóide com a zona pelúcida do oócito, tem como objetivo a reação acrossomal, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais (JAISWAL et al.,1999; SILVA e GADELLA, 2006) que são fundamentais para que ocorra a fecundação. Portanto, a avaliação da integridade acrossomal antes dos processos de reprodução assistida vem sendo cada vez mais empregada, visto que a

integridade do acrossoma é um aspecto fundamental para a fertilização (SILVA e GADELLA, 2006).

Muitas técnicas de coloração têm sido usadas com relativo sucesso para se determinar a porcentagem de espermatozóides que sofreram reação acrossomal (*status* acrossomal) como por exemplo, as que empregam os corantes Azul de Trypan/Giemsa (KOVÁCS & FOOTE, 1992; COSTA, 2000; RESENDE, 2007), “Chicago sky Blue” (KÚTVÖLGYI et al., 2006) e técnicas que utilizam lectinas conjugadas a fluoresceína (FARLIN et al., 1992; VALCÁRCEL et al, 1997; ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005).

O caráter glicoproteico dos componentes acrossomais fornece um meio de mensurar a integridade do acrossoma, por preenchimento da matriz acrossomal de espermatozóides que apresentem acrossomo lesado, com lectinas conjugadas como por exemplo a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA). A PSA se liga de forma específica a carboidratos das glicoproteínas (glicoconjugados) presentes na matriz acrossomal, ou seja, esta aglutinina possui afinidade por resíduos glicoprotéicos específicos, se associando desta forma, a açúcares α-manosideos encontrados nos conteúdos acrossomais (CELEGHINI, 2005).

Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, a PSA deve ser conjugada a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (CELEGHINI, 2005). Assim, o acrossomo lesionado é marcado com sucesso, emitindo uma coloração verde-amarelada, o que facilita sua visualização e identificação. Portanto, a ausência da fluorescência é indicativo de células com o acrossomo intacto, e a fluorescência evidencia lesões ou reação acrossomal (SILVA & GADELLA, 2006).

A FITC-PSA têm sido utilizada para avaliar integridade do acrossomo em diversas espécies (GRAHAM et al., 1990; FARLIN et al., 1992; MENDOZA et al., 1992; CASEY et al. 1993; ARRUDA, 2000; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; ARRUDA et al., 2003 ; CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2005; ANDRADE et al, 2007; ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, SOUZA (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame da membrana acrossomal para amostras de sêmen eqüino pós-

descongelação. Os testes realizados foram: câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, coloração por Azul de Trypan /Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando como marcador o FITC-PSA. Verificou-se que a técnica de microscopia de epifluorescência com a sonda fluorescente FITC-PSA foi a mais eficiente em detectar lesões de acrossomo.

2.3.3.3. Avaliação da Membrana Mitocondrial

As mitocôndrias espermáticas estão localizadas na peça intermediária do espermatozóide e sua principal função é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP. A membrana mitocondrial interna é o local de produção dessa energia metabólica, sendo essencial para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão (AUGER et al., 1989; CELEGHINI, 2005; SILVA & GADELLA, 2006; SOUSA, 2007) e a penetração do espermatozóide no oócito. Portanto, a mitocôndria tem papel fundamental na motilidade e, segundo MARCHETTI et al. (2004), a análise da função mitocondrial pode oferecer uma maneira de acessar a motilidade espermática.

O potencial de membrana mitocondrial interno é gerado pela cadeia respiratória e coordena a síntese de ATP mitocondrial. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias dentro das células pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (DUCHEN et al., 1993 apud CELEGHINI, 2005).

Muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido discutidos, havendo grande ênfase em favor das sondas fluorescentes, mais especificamente as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS et al., 1991).

De acordo com ARRUDA et al. (2007), a sonda carbocianina catiônica lipofílica, JC-1 (iodeto de 5,5`,6,6`-tetracloro1,1`,3,3`-tetraetilbenzimidazolocarbocianina), difere das rodaminas e de outras carbocianinas por produzir dois picos de emissão de fluorescência que refletem a existência de duas formas da sonda (os monômeros JC-1

e os agregados JC-1) identificando populações de mitocôndrias com diferentes potencias de membrana por meio de códigos de cor.

Este corante, penetra na organela e emite fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha (pico de emissão máximo 590 nm) ou verde (emissão 520 nm), de acordo com o potencial de membrana mitocondrial interna. Penetrando em altas concentrações, o corante apresenta-se na forma de j-agregado e emite coloração vermelha e, em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Desta forma, em mitocôndrias funcionais, o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha, ao passo que, mitocôndrias com baixo a médio potencial de atividade de membrana fluorescem verde (GARNER et al., 1997; CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2007).

Para avaliar a eficiência do JC-1 em predizer a funcionalidade da mitocôndria, BRADBURY et al*.* (2000) coraram células leucêmicas humanas com este fluocromo e encontraram alta correlação positiva entre a quantidade de ATP intracelular e a percentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial. MARCHETTI et al. (2004), demonstraram ainda que o JC-1, entre outros fluorocromos, detectou mudanças específicas no potencial de membrana mitocondrial e encontrou correlação positiva com a porcentagem de células com alto potencial mitocondrial e motilidade progressiva.

Desta forma, este corante fluorescente vem sendo utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial, em diferentes espécies como na espécie humana (TROIANO et al., 1998); bovina (GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998; CELEGHINI et al., 2007), eqüina (GRAVANCE et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008), ovina (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004) e suína (ANDRADE et al., 2007).

2.3.3.4. Associação das Sondas fluorescentes

Como descrito acima, os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozóides, sendo um importante parâmetro de avaliação. As

sondas fluorescentes são utilizadas isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular (ARRUDA et al., 2007).

A combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversas estruturas celulares simultaneamente. Desta forma, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar concomitantemente mais do que um compartimento da célula espermática em diversas espécies (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; MARTINEZ-PASTOR et al., 2004; CELEGHINI et al., 2007)

CELEGHINI (2005) preconizando a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de uma mesma célula espermática de maneira prática e direta, testou e validou técnicas de associação de sondas fluorescentes. Dentre as técnicas validadas (“PI, FITC-PSA e MitoTracker GreenFM” ou “PI, FITC-PSA e CMXRos” ou “PI, FITC-PSA e JC-1”), a associação PI, FITC-PSA e JC-1 demonstrou ser a melhor, devido a objetividade e simplicidade de aplicação. Ainda, foi a única associação que permitiu separar as populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

3. HIPÓTESES

De acordo com os relatos da revisão de literatura da presente dissertação e com os trabalhos realizados no laboratório de reprodução animal da FCAV/UNESP Jaboticabal, levantam-se as seguintes hipóteses:

3.1 A seleção do sexo de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade não agride as células espermáticas de maneira significativa, por se tratar de uma metodologia bastante simples;

3.2 Ocorre melhora das características relacionadas à qualidade espermática após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade, devido à propriedade inerente ao Percoll™.

4. OBJETIVOS

Com o intuito de obter informações mais precisas e monitorar os efeitos do procedimento de seleção do sexo de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade, de modo a verificar a qualidade dos espermatozóides após este método de sexagem, os objetivos deste trabalho foram:

a) Avaliar os efeitos do processo de sexagem de espermatozóides bovinos criopreservados por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ sobre:

- A motilidade e o vigor espermático (visualmente analisados)
- A morfologia espermática
- Os parâmetros de motilidade e movimento espermático (analisados pelo sistema CASA)
- A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial por associação das sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1)

b) Comparar os efeitos deste procedimento entre as subespécies bovinas (Bos taurus taurus X Bos taurus indicus)

c) Avaliar as taxas de recuperação espermática pós-centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ para a seleção do sexo de espermatozóides bovinos criopreservados e compará-las entre as subespécies bovinas (Bos taurus taurus X Bos taurus indicus).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e Período Experimental

O local de realização do preparo da solução de trabalho para o gradiente de densidade (Percoll™) foi o Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias - UNESP Jaboticabal – SP. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP Pirassununga, durante o mês de julho de 2008.

5.2. Obtenção dos espermatozóides e delineamento experimental

As doses de sêmen congeladas em diluidor TRIS-Gema foram adquiridas de empresa especializada em congelação e comercialização de sêmen. Utilizou-se doses de seis touros de diferentes raças, sendo três deles de raças taurinas (Angus, Holandêsa e Jersey) e três de raças zebuínas (Gir, Guzerá e Nelore) e foram feitas quatro repetições para cada um dos touros (para cada touro, avaliou-se quatro partidas diferentes: 6 touros X 4 partidas de cada, n=24). Essas doses foram descongeladas a 37℃ por 30 segundos e submetidas às avaliações das características espermáticas antes (Grupo Controle) e após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ (Grupo Centrifugado).

Desta forma, todas as doses do Grupo Controle e do Grupo Centrifugado foram submetidas à avaliação da concentração, motilidade visual, vigor, avaliação morfológica dos espermatozóides, avaliação computadorizada do sêmen (CASA) e avaliação da integridade de membranas espermáticas pela associação das sondas fluorescente (PI, FITC-PSA e JC-1). Para a realização do experimento, dez palhetas de sêmen (0,25 mL) de cada partida foram descongeladas. O delineamento deste trabalho encontra-se ilustrado na Figura 2.

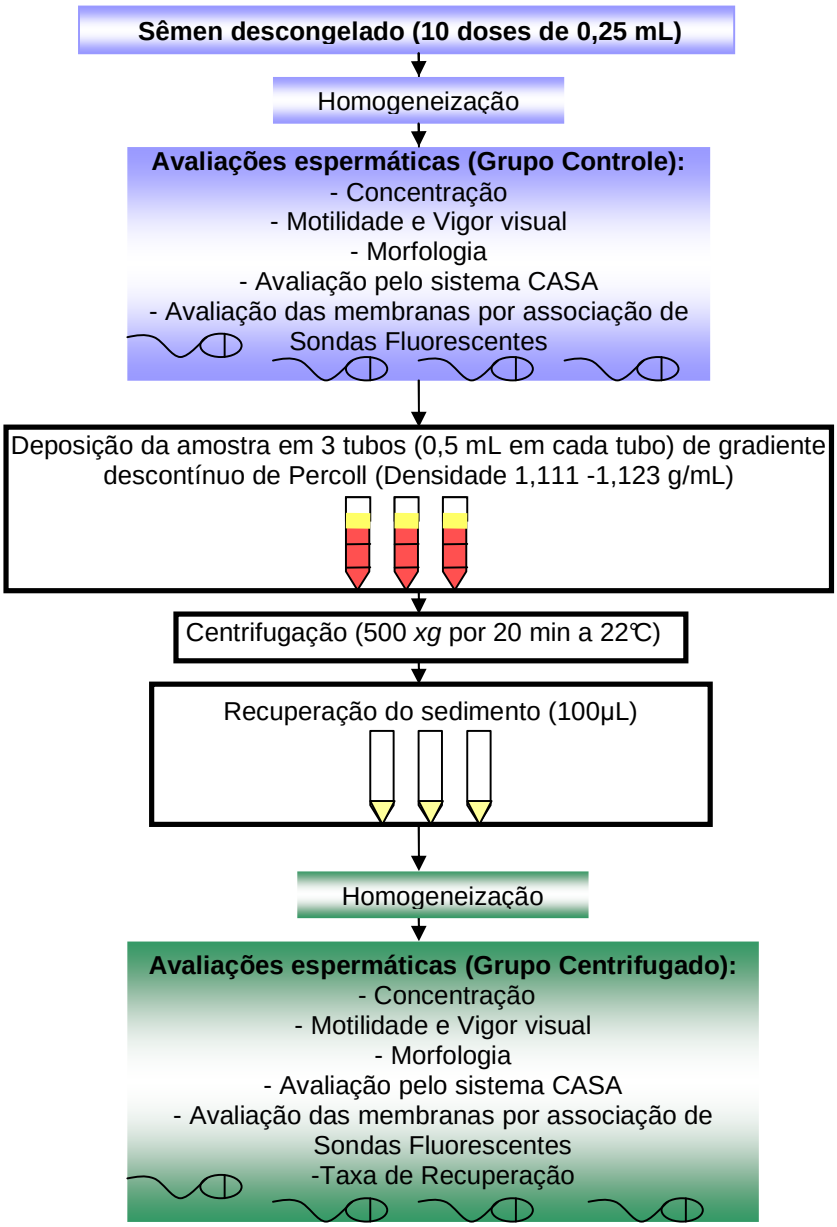


Figura 2. Delineamento experimental

5.3. Preparação do gradiente de sexagem

5.3.1 Solução para gradiente de Percoll™

A solução foi preparada de acordo com HOSSEPIAN de LIMA (2005). Preparava-se a solução estoque (SE) diluindo-se 9 partes de Percoll™ (densidade 1,30 g/mL) em uma parte de “Dubelcco`s Modified Eagle`s Medium” (DMEM - densidade 1,058 g/mL; 1:9 v/v) concentrado 10 vezes (DMEM 10X), complementado com 0,01 g/L de antibiótico e 6mM de HEPES (pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H_2O). O DMEM 10X concentrado era preparado diluindo-se em 100 mL de água (ultrapura bidestilada do Sistema Milli Q) a quantidade necessária para preparar 1litro. Em seguida, filtrava-se em membrana com poros de 0,22µm e estocava-se em temperatura entre 4 a 6 ºC, por no máximo 15 dias. Para obter os gradientes descontínuos de densidade, soluções isotônicas (280-320 mOsm/kg de H_2O) com densidades diferentes eram preparadas diluindo-se diferentes porções de SE (Percoll™ 90%) em meio DMEM 1X complementado com antibiótico, 6mM de HEPES e 0,3 a 0,6% de albumina sérica bovina (BSA) fração V (pH 7,4).

5.3.2. Preparação do gradiente descontínuo de densidade

O gradiente de densidade foi preparado depositando-se cada uma das soluções (as camadas de diferentes densidades de Percoll™, 80%, 85% e 90%), em tubos cônicos de poliestireno com o auxílio de um pipetador de repetição (Figura 3). Desta forma, cada tubo com o gradiente descontínuo de Percoll™ continha três camadas de 3 mL, com densidades variando de 1,110 a 1,123g/mL (HOSSEPIAN de LIMA, 2005; LUCIO, 2007; PERINI, 2007). Para cada partida de sêmen, confeccionava-se três tubos de gradiente descontínuo de Percoll™.

Figura 3. Confecção do gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.

5.4. Centrifugação e recuperação dos espermatozóides no gradiente de sexagem

Após a confecção dos gradientes, 10 palhetas de sêmen de 0,25 mL foram descongeladas em banho-maria a 37℃ por 20 segundos. O sêmen descongelado foi colocado em um microtubo e homogeneizado (2,5 mL). Retirava-se parte desta amostra (1,5 mL) para ser depositada sobre os três tubos (0,5 mL de sêmen em cada tubo) com gradientes de Percoll™ (Figura 4). A outra parte (1,0 mL restante) era destinada à avaliação da concentração (câmara de Neubauer) e da qualidade espermática (motilidade e vigor visual, sistema CASA, morfologia, e associação de sondas fluorescentes) do Grupo Controle.

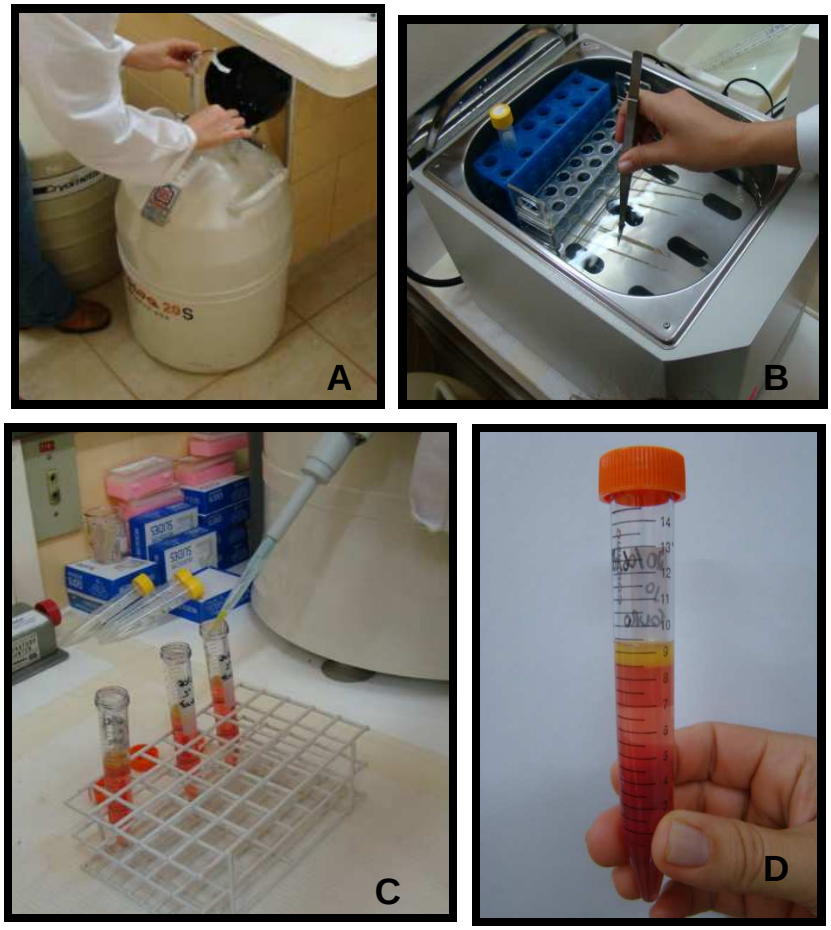


Figura 4. Sequência da deposição do sêmen sobre o gradiente descontínuo de Percoll™. **A:** Retirada do sêmen congelado. **B:** Descongelação do sêmen em Banho-Maria. **C:** Deposição do sêmen sobre os tubos contendo o gradiente de Percoll™. **D:** Tubo com o gradiente de Percoll™ e o sêmen pré-centrifugação.

Os tubos contendo os gradientes e o sêmen foram centrifugados a 500 x *g* em rotor horizontal (Centrífuga refrigerada Sorvall® RC 33 Plus) na temperatura de 22℃, por 20 minutos. Após a centrifugação, aspirava-se os sobrenadantes dos três tubos com uma seringa adaptada (Figura 5). Os sedimentos contendo os espermatozóides nos três tubos (100 µL em cada tubo) foram recuperados com a utilização de um pipetador automático e homogeneizados. Em seguida, os espermatozóides recuperados foram utilizados nos mesmos procedimentos de avaliação da concentração e da qualidade espermática (Grupo Centrifugado) para posterior comparação dos resultados pré e pós-centrifugação.

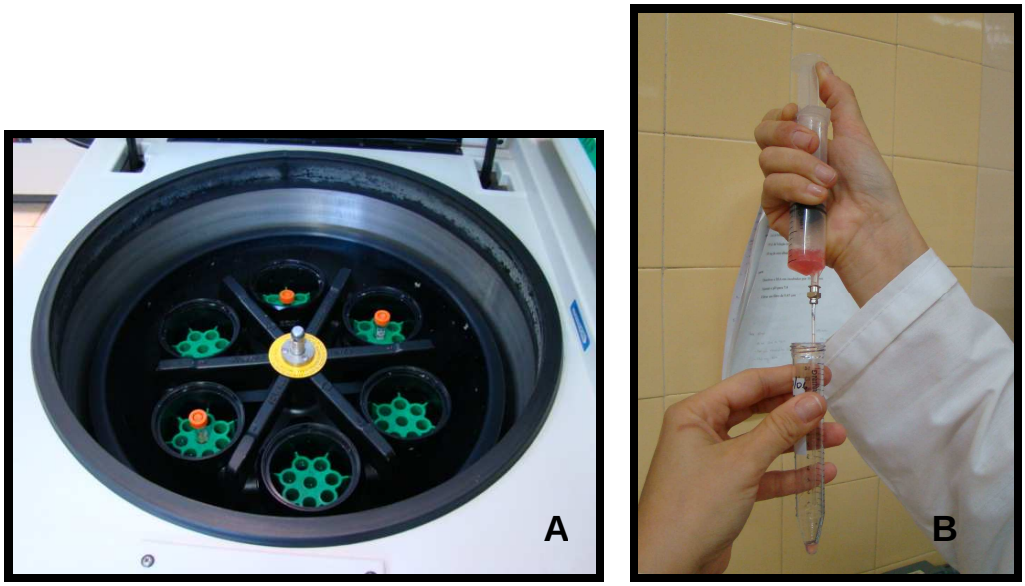


Figura 5. A: Centrifugação em centrifuga refrigerada de rotor horizontal. **B:** Recuperação do gradiente sobrenadante após a centrifugação.

5.5. Avaliação das características espermáticas

A avaliação espermática foi realizada logo após a descongelação (amostras Grupo Controle) e repetida após o procedimento de centrifugação em gradiente de Percoll™ (amostras Grupo Centrifugado). As características físicas dos espermatozóides analisadas foram: concentração espermática; motilidade e vigor visual; movimento espermático pelo CASA; integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial; e taxa de recuperação pós-centrifugação.

5.5.1. Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada contando os espermatozóides, com o emprego da câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum com aumento de 400X. Para mensuração da concentração na amostra do Grupo Controle, adicionou-se 20 µL de sêmen descongelado em 980 µL de Formol Salina Tamponada (diluição de 1:50) e o microtubo contendo essa amostra foi armazenado (em temperatura de 4℃) para posterior avaliação da morfologia espermática.

Da mesma forma, avaliou-se a concentração espermática na amostra do sêmen centrifugado, no entanto, em virtude de um menor número de células totais na amostra, realizou-se a diluição de 1:20 (20 µL de sêmen em 380 µL de Formol Salina Tamponada) que também foi armazenada.

5.5.2. Avaliação visual da motilidade e vigor

A avaliação convencional da motilidade e do vigor foi baseada na análise visual (sob microscopia óptica) da porcentagem de espermatozóides móveis e do escore da energia das células em movimento (1-5). Para a realização dessas avaliações, analisou-se uma gota de sêmen (Controle e Centrifugado) entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37℃) sob microscópio óptico em aumento 100X.

5.5.3. Morfologia espermática

Para a realização do exame de morfologia espermática, utilizou-se o sêmen diluído em formol salino tamponado previamente armazenado em microtubos (antes e após a centrifugação). Para leitura, foi preparada uma câmara úmida, com uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula, sob microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (Nikon, 80i) com aumento de 1000X . A avaliação foi realizada contando-se 200 espermatozóides por lâmina e anotando-se as alterações morfológicas observadas.

5.5.4. Avaliação pelo sistema CASA (Avaliação computadorizada do sêmen)

Após o cálculo da concentração da amostra, uma alíquota do sêmen descongelado foi diluído em meio TALP sperm (BAVISTER et al., 1983) (anexo 1) de forma a obter uma amostra com aproximadamente 25 X 10^6 espermatozóides/mL para a avaliação no sistema computadorizado (CASA).

Uma alíquota de 2 µL da amostra a ser analisada foi disposta na lâmina de leitura (Leja® standard count, SC20.01.FA, 20 micron) previamente aquecida a 37º C, a qual foi inserida no aparelho da Hamilton Thorne Biosciences (Figura 6), que captura a

imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador. Este envia os dados para um programa computacional, o qual foi previamente ajustado (“setup”) para análise de sêmen bovino. No mínimo quatro campos foram selecionados para a leitura, buscando sempre a análise dos melhores campos, ou seja, campos sem artefatos (bolhas, partículas ou outros elementos) que pudessem prejudicar a avaliação.

Os parâmetros da cinética espermática analisados foram: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (MP;%), Velocidade de Trajeto (VAP; µm/s), Velocidade Progressiva (VSL; µm/s), Velocidade Curvilinear (VCL; µm/s), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; µm), Freqüência de Batimentos (BCF; Hz), Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN;%) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %).

Para a avaliação do sêmen centrifugado, realizou-se o mesmo procedimento e analisou-se os mesmos parâmetros, no entanto, devido a uma menor quantidade total de espermatozóides presentes na amostra (sedimento), não se realizou a diluição prévia da amostra em meio TALP.

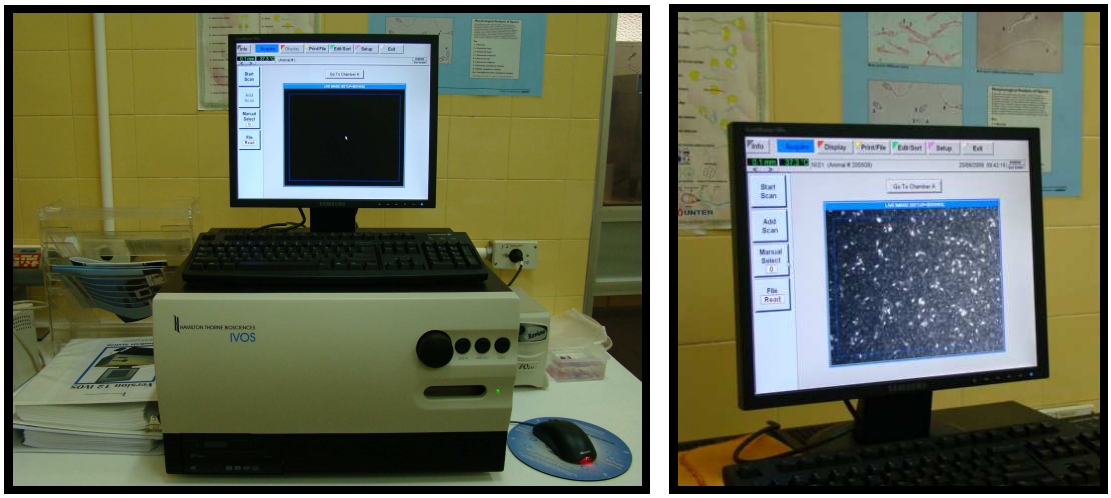


Figura 6. Aparelho Hamilton Thorne Biosciences – USP/Pirassununga.

5.5.5. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes

Para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial das amostras, utilizou-se a técnica de associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1).

Para a análise do sêmen descongelado, utilizou-se uma alíquota do sêmen diluído em meio TALP (25 X 10^6 espermatozóides/mL), visando uma melhor visualização da fluorescência emitida pelas sondas.

A amostra foi então submetida a técnica de coloração tripla de sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 conforme descrição de CELEGHINI (2005) para sêmen congelado (Anexo 2). Após descongelação e diluição, colocou-se uma alíquota de 150 µL do sêmen em um microtubo, e adicionou-se 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS; Sigma, 28,707-5), 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL Sigma em DPBS; L-0770) e 6 µL de JC-1 (153 µM em DMSO; Molecular Probes, T-3168). Esta mistura foi homogeneizada e incubada à 37℃ por 10 minutos, na ausência de luz. Após esse período de incubação, uma gota de 6 µL desta amostra foi retirada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37℃) e imediatamente avaliada em microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência, Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655) (Figura 7). Para a leitura, em aumento de 1000X, as células foram classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda.

A integridade da membrana plasmática foi detectada pela sonda PI e a presença de fluorescência vermelha na cabeça evidenciou a lesão da membrana plasmática. A integridade da membrana acrossomal foi detectada pela sonda FITC-PSA, de forma que a fluorescência verde intenso no acrossoma evidenciou lesão acrossomal. A função mitocondrial foi indicada pela sonda por JC-1, e as fluorescências vermelha e verde da peça intermediária evidenciaram, respectivamente, alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Figura 7. Microscópio de Epifluorescência, Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i – USP/Pirassununga.

Desta forma, contou-se 200 células por lâmina, identificando oito classes distintas de espermatozóides (Figura 8) de acordo com o padrão descrito por CELEGHINI (2005):

-Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA) (Figura 9);

-Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com baixo potencial mitocondrial (PIAIB);

-Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial (PIALA);

-Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PIALB) (Figura 9);

-Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PLAIA);

-Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial (PLAIB);

-Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial (PLALA);

-Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PLALB) (Figura 9).

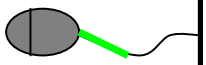
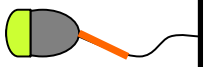
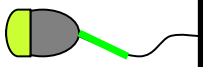
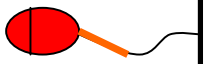
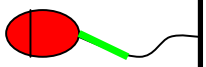
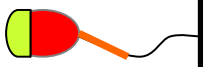
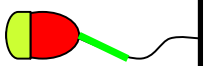
CÉLULA ESPERMÁTICA	PI	FITC-PSA	JC-1	Espermatozóide
-Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA);	-	-	laranja-avermelhado	
-Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com baixo potencial mitocondrial (PIAIB);	-	-	verde	
-Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com alto potencial mitocondrial (PIALA);	-	+	laranja-avermelhado	
-Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com baixo potencial mitocondrial (PIALB);	-	+	verde	
-Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PLAIA);	+	-	laranja-avermelhado	
-Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com baixo potencial mitocondrial (PLAIB);	+	-	verde	
-Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com alto potencial mitocondrial (PLALA);	+	+	laranja-avermelhado	
-Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com baixo potencial mitocondrial (PLALB)	+	+	verde	
OBS: PI positivo (+) = núcleo corado em vermelho; FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada				

Figura 8. Esquema da classificação das células espermáticas de acordo com a sonda fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005). Adaptado de GONÇALVES, 2006.

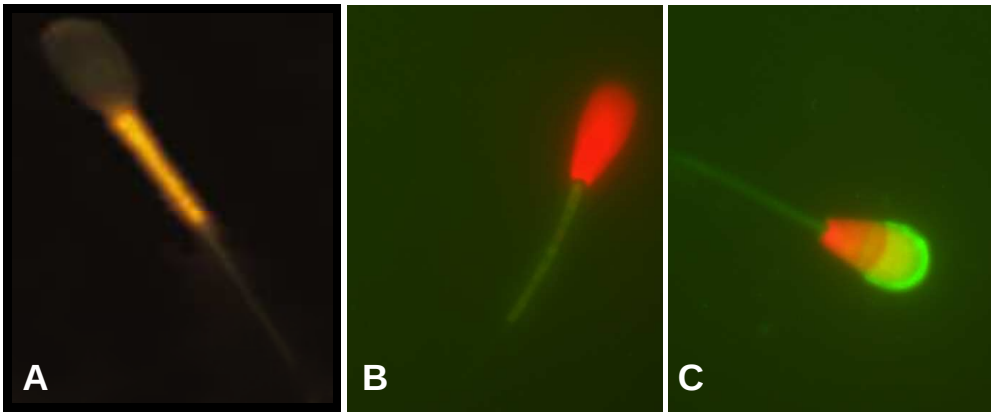


Figura 9. Fotomicrografia de espermatozóides corados pela associação de corantes fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1. **A:** Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA). **B:** Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial (PLAIB). **C:** Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PLALB). (Aumento 1000 X). USP -Pirassununga/SP.

Ainda, a partir do percentual de cada uma destas categorias de células acima descritas, avaliou-se o total de células com Membrana Plasmática Intacta (MPI), onde MPI = PIAIA+PIAIB+PIALA+PIALB, o total de células com Acrossoma Intacto (ACI), onde ACI=PIAIA+PIAIB+PLAIA+PLAIB, e o total de células com Alto Potencial Mitocondrial (APM), onde APM=PIAIA+PIALA+PLAIA+PLALA.

Após a centrifugação, repetiu-se todo o procedimento para a avaliação das membranas espermáticas na amostra de sêmen centrifugado, com exceção porém, da etapa de diluição em meio TALP.

5.5.6. Taxa Recuperação (TR)

Neste experimento, mensurou-se a recuperação dos espermatozóides após a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ utilizando as variáveis:

- [1] Volume inicial da amostra submetida à centrifugação (3 X 500µL);
- [2] Concentração de espermatozóides na palheta do sêmen descongelado (determinada utilizando-se a câmara de Neubauer)

- [3] Volume final da amostra recuperada após a centrifugação (3 X 100µL);
- [4] Concentração de espermatozóides no sedimento (determinada utilizando-se a câmara de Neubauer);

Desta maneira, a taxa de recuperação (TR) dos espermatozóides foi calculada pela seguinte equação:

$$TR = \left[\frac{(\text{volume final}^{3} \text{ X concentração final}^{4})}{(\text{volume inicial}^{1} \text{ X concentração inicial}^{2})} \right] \text{ X } 100$$

5.6 Análise estatística

Para avaliar o efeito da centrifugação de espermatozóides em gradientes de densidade de Percoll™ sobre a qualidade espermática, os dados foram analisados de acordo com os parâmetros avaliados. Os valores em porcentagem e/ou que não respeitaram as premissas foram transformados em arco-seno para a análise estatística. A metodologia estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5% pelo programa SAS (“Statistical Analysis System”; Sas Institute Inc., 2001). Desta forma, verificou-se os resultados da avaliação espermática pré e pós centrifugação, ou seja, as diferenças espermáticas qualitativas entre os grupos Controle (espermatozóides descongelados) e Centrifugado (espermatozóides recuperados após a centrifugação) das amostras de sêmen analisadas. Para verificar se houve efeito do tratamento (Controle ou Centrifugado) nas duas subespécies (Taurina e Zebuína), as análises foram inteiramente casualizadas em arranjo fatorial 2X2. A análise de variância está representada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise de variância para o delineamento com 2 tratamentos (Controle e Centrifugado) e 2 subespécies bovinas (taurina e zebuína).

Causa de Variação		Grau de Liberdade
Tratamento (3)	Subespécie	1
	Sexagem	1
	Interação subespécie X sexagem	1
Resíduo		44
Total		**47**

6. RESULTADOS

Os resultados de ANOVA constataram efeitos significativos (P<0,05) entre os tratamentos (Controle e Centrifugado) para todos as avaliações (motilidade visual, vigor, defeitos maiores e menores, MT, MP, VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN, STR, RAPID, células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial), podendo ser observado que houve influência do processo de seleção do sexo de espermatozóides bovinos por centrifugação nos valores obtidos nas avaliações de qualidade espermática. Apenas no resultado dos defeitos totais da análise de características morfológicas espermáticas, não se observou influência do tratamento no resultado (P>0,05).

Apenas na avaliação de morfologia espermática (somente para defeitos menores e totais) e em dois parâmetros da avaliação pelo sistema CASA (BCF e STR) houve influência (P<0,05) da subespécie. Em nenhuma avaliação realizada houve efeito de interação entre tratamento e subespécie. Os resultados das médias e seus respectivos erros padrão, para cada avaliação espermática realizada, estão apresentados separadamente em gráficos e tabelas, conforme descrito a seguir.

6.1. Avaliação visual da Motilidade e Vigor

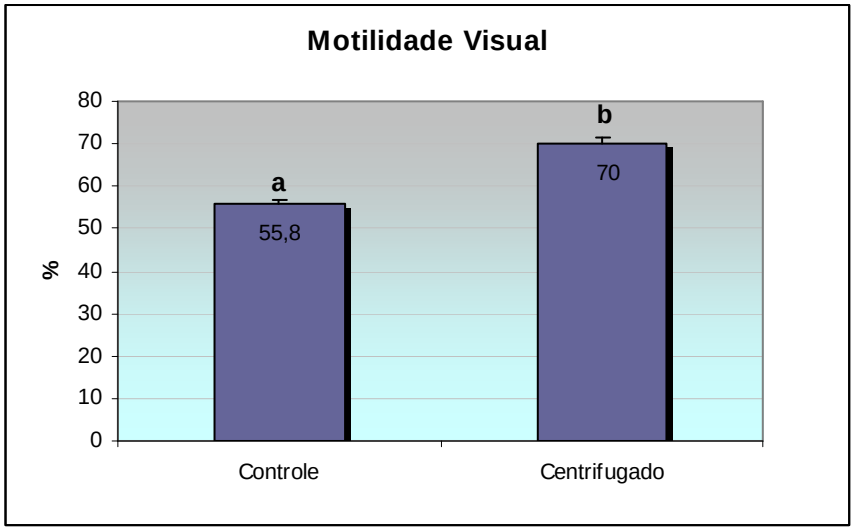
A centrifugação do sêmen melhorou a motilidade espermática estimada visualmente, uma vez que essa foi significativamente menor (P<0,0001) no sêmen após a descongelação (55,84 ± 1,19%) do que no sêmen pós-centrifugação (70,00 ± 1,59%), indicando que houve seleção de espermatozóides móveis neste gradiente, como representado na Tabela 2 e visualizado na Figura 10. Entre as subespécies Taurina e Zebuína não houve diferença estatística (P>0,05) para a motilidade espermática visual (62,92 ± 2,17% e 62,92 ± 1,90%, respectivamente) antes ou após a centrifugação, como também pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Médias (± Erros Padrão) da motilidade espermática estimadas visualmente antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	Tratamento		Motilidade
	Controle	Centrifugado	Total (%)
Angus	55,0 ±3,5	67,5±3,2	
Holandes	60,0±0,0	77,5±2,5	
Jersey	50,0±2,0	67,5±4,3	
Taurinos Total	55,0 ± 1,7	70,8 ± 2,3	**62,9±2,2 A**
Gir	61,3±2,4	72,5±3,2	
Guzerá	56,3±1,3	73,8±3,1	
Nelore	52,5±3,2	61,3±2,4	
Zebuínos Total	56,7 ± 1,7	69,2 ± 2,3	**62,9±1,9 A**
Total (%)	**55,8 ± 1,2 a**	**70,0 ± 1,6 b**	

a,b: Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

A: não houve diferença significativa (p>0,05).



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (p<0,0001)

Figura 10. Médias da motilidade espermática estimada visualmente antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.

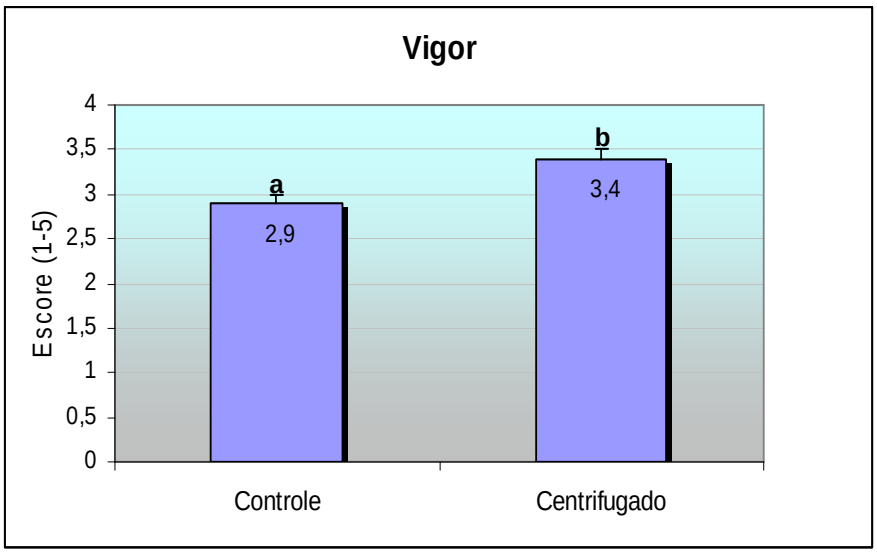
O vigor dos espermatozóides centrifugados (3,42 ± 0,08) foi maior (P<0,0001) que o vigor dos espermatozóides controle (2,90 ± 0,06) como ilustrado na Figura 11. Também não foi observada diferença (P>0,05) entre as subespécies bovinas nesta avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Médias (± Erros Padrão) do vigor espermático estimadas visualmente antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	**Tratamento**		**Vigor**
	Controle	**Centrifugado**	**Total (1-5)**
Angus	2,6 ±0,1	3,3±0,1	
Holandes	3,0±0,0	3,8±0,1	
Jersey	2,9±0,1	3,1±0,1	
Taurinos Total	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	**3,1±0,1 [A]**
Gir	3,3±0,1	3,6±0,2	
Guzerá	2,9±0,1	3,8±0,1	
Nelore	2,8±0,1	3,0±0,0	
Zebuínos Total	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,1	**3,2±0,1 [A]**
Total (1-5)	**2,9 ± 0,1[a]**	**3,4 ± 0,1[b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

A: não houve diferença significativa (p>0,05).



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (p<0,0001)

Figura 11. Médias do vigor espermático antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.

6.2. Avaliação das características morfológicas dos espermatozóides

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão ilustrados, respectivamente, os resultados de defeitos maiores, menores e totais, obtidos com a avaliação das características morfológicas dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™.

Os percentuais de defeitos maiores reduziram significativamente (p<0,0001) após a centrifugação (5,29 ±1,06%) em relação ao percentual encontrado no sêmen controle (13,00 ± 1,24%) e não houve diferença estatística entre as subespécies (Tabela 4).

O inverso foi observado com o percentual de defeitos menores, que, após a centrifugação (15,44 ± 2,25%), as amostras de sêmen apresentaram aumento significativo (p<0,0001) em relação as amostras de sêmen pós-descongelação (5,35 ± 0,85%). Além disso, foi detectada diferença significativa (p<0,05) entre as duas subespécies, visto que os taurinos apresentaram menores valores percentuais de

defeitos menores (7,71 ± 1,69%) que os zebuínos (13,08 ± 2,12%), como pode ser observado na Tabela 5.

Em relação ao percentual do total de defeitos obtidos pela avaliação morfológica dos espermatozóides, não foi observada diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos (18,35 ± 1,40% no Grupo Controle e 20,73 ± 3,01 % no Grupo Centrifugado). No entanto, observou-se diferença significativa (P<0,05) entre as subespécies, e taurinos apresentaram menores percentuais de defeitos totais (15,73 ± 2,09%) que os zebuínos (23,35 ± 2,35%) como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 4. Médias (± Erros Padrão) dos defeitos maiores da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	**Tratamento**		**Defeitos Maiores**
	Controle	**Centrifugado**	**Total (%)**
Angus	15,3±2,7	6,8±1,3	
Holandes	7,0±2,0	0,4±0,2	
Jersey	13,9±2,2	4,9±0,8	
Taurinos Total	12,0 ± 1,6	4,0 ± 1,9	**8,0 ± 1,2 [A]**
Gir	9,4±1,6	3,6±0,8	
Guzerá	11,6±0,6	1,8±0,5	
Nelore	20,9±3,4	14,4±2,6	
Zebuínos Total	14,0 ± 0,9	6,6 ± 1,9	**10,3 ± 1,5 [A]**
Total (%)	**13,0 ± 1,2 [a]**	**5,3 ±1,1 [b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

A: não houve diferença significativa (p>0,05).

Tabela 5. Médias (± Erros Padrão) dos defeitos menores da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	Tratamento		Defeitos Menores
	Controle	Centrifugado	Total (%)
Angus	5,4±2,2	14,3±4,7	
Holandes	2,8±0,9	2,5±1,1	
Jersey	5,6±1,1	15,8±6,7	
Taurinos Total	4,6 ± 0,9	10,8 ± 3,1	**7,7 ± 1,7 [A]**
Gir	5,4±1,7	8,3±1,4	
Guzerá	10,5±3,1	22,4±2,3	
Nelore	2,5±0,3	29,5±1,2	
Zebuínos Total	6,1± 1,5	20,0 ± 2,8	**13,1 ± 2,1 [B]**
Total (%)	**5,4 ± 0,9 [a]**	**15,4 ± 2,3 [b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05).

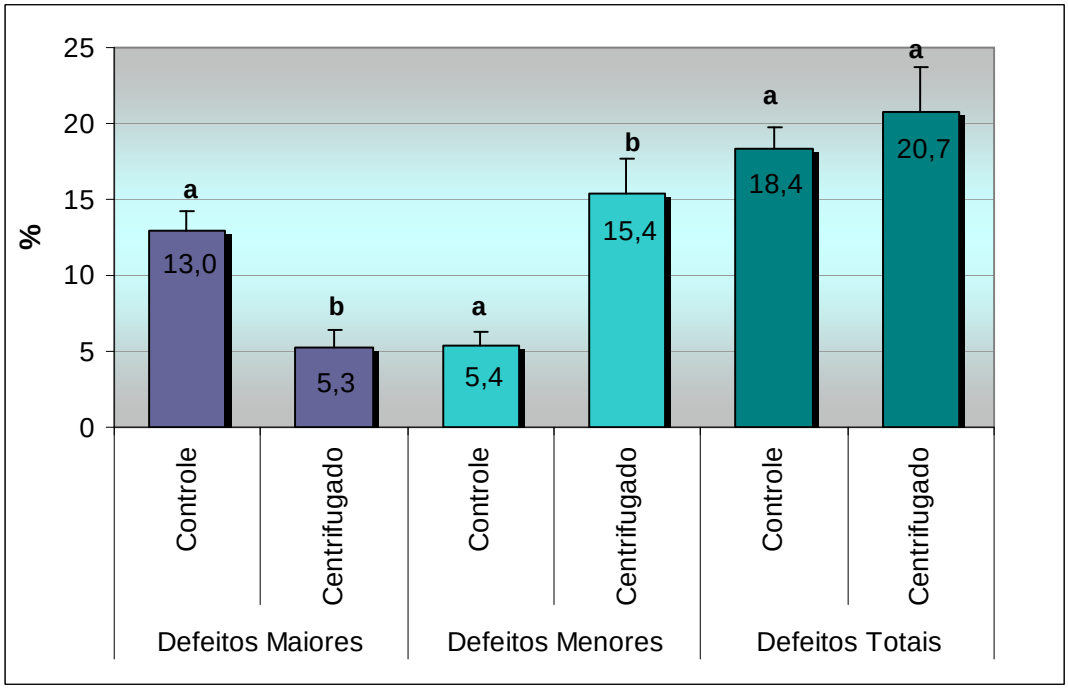
Tabela 6. Médias (± Erros Padrão) do total de defeitos da avaliação morfológica dos espermatozóides antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	Tratamento		Total de Defeitos
	Controle	Centrifugado	Total (%)
Angus	20,6±3,5	21,0±5,5	
Holandes	9,8±1,7	2,9±1,0	
Jersey	19,5±1,2	20,6±7,5	
Taurinos Total	16,6 ± 1,9	14,8± 3,8	**15,7 ± 2,1 [A]**
Gir	14,8±3,2	11,9±2,1	
Guzerá	22,1±3,2	24,1±2,1	
Nelore	23,4±3,1	43,9±2,5	
Zebuínos Total	20,1 ± 2,0	26,6 ± 4,1	**23,4 ± 2,4 [B]**
Total (%)	**18,4 ± 1,4 [a]**	**20,7 ± 3,0 [a]**	

a: Não houve diferença significativa (p>0,05).

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05).

Na figura 12 estão ilustradas as diferenças encontradas na avaliação das alterações morfológicas do sêmen antes (controle) e após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™.



Letras diferentes sobre barras indicam diferença significativa (P<0,05)

Figura 12. Médias das alterações morfológicas dos espermatozóides (Defeitos Maiores, Defeitos Menores e Defeitos Totais) antes (Controle) e após (Centrifugado) processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.

6.3. Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA)

A avaliação pelo sistema CASA permitiu avaliar diferentes parâmetros relacionados à cinética da motilidade dos espermatozóides. Na Tabela 7 é possível verificar que o método de seleção do sexo por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ apresentou efeitos favoráveis sobre a motilidade espermática avaliada pelo sistema CASA. O sêmen centrifugado apresentou significativamente maior (P<0,0001)

Motilidade Total (MT = 84,97 ± 1,79%) e Progressiva (MP = 75,90 ± 1,66%) do que o sêmen descongelado (Controle) que apresentava valores para MT e MP de 69,88 ± 1,72% e 59,23 ± 1,64%, respectivamente. Na figura 13 estão ilustrados esses valores de Motilidade Total e Progressiva da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação. Entre as subespécies bovinas, não houve diferença significativa (P>0,05) para MT e MP (Tabela 7).

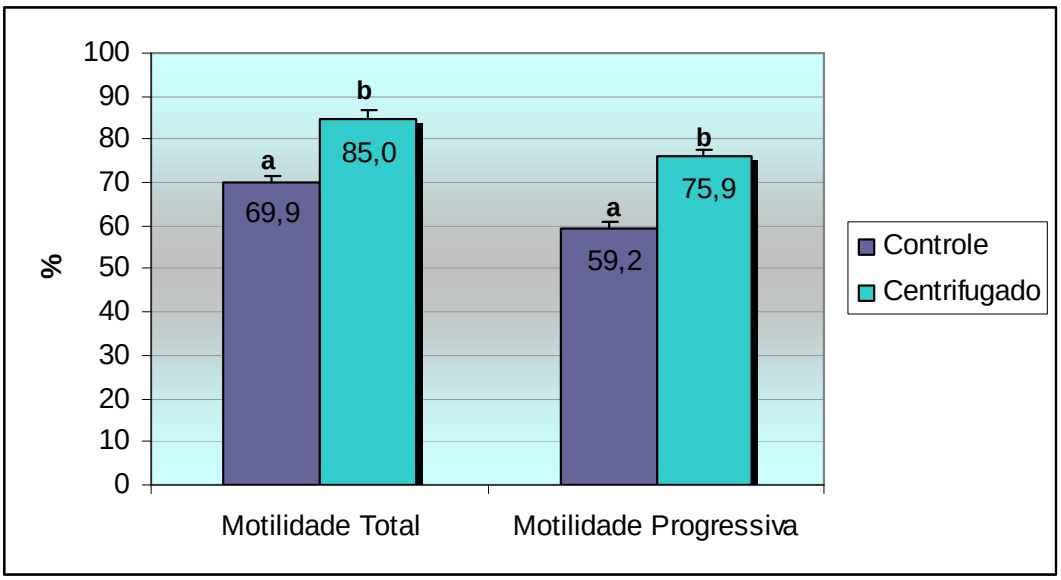
Tabela 7. Médias (± Erros Padrão) da Motilidade Total e Progressiva da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	Motilidade Total (MT)		MT	Motilidade Progressiva (MP)		MP
	Tratamento			Tratamento		
	Controle	Centrifugado	Total (%)	Controle	Centrifugado	Total (%)
Taurinos	69,4 ± 2,6	86,6±2,5	**78,0±2,5 A**	59,0±1,9	78,7±2,2	**68,8±1,9 A**
Zebuínos	70,3± 2,4	83,3±2,5	**76,8±2,5 A**	59,5±2,8	73,1±2,3	**66,3±2,5 A**
Total (%)	**69,9 ± 1,7 a**	**85,0 ± 1,8 b**		**59,2 ± 1,6 a**	**75,9 ± 1,7 b**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A: Não houve diferença significativa (p>0,05). [1]

[1] As tabelas completas da análise computadorizada do sêmen (CASA) se encontram no final da dissertação (Apêndice C - anexo 3)



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,0001)

Figura 13. Médias da Motilidade Total e Progressiva avaliadas pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.

As velocidades espermáticas avaliadas pelo CASA, isto é, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) são apresentadas na Tabela 8 e denotam uma diminuição significativa (P<0,01) nestes parâmetros após a centrifugação. Os espermatozóides descongelados (Grupo Controle) apresentaram resultados mais altos para VAP (107,62 ± 4,83 µm/s), VSL (91,14 ± 4,07 µm/s) e VCL (173,18 ± 8,86 µm/s) do que os obtidos após a centrifugação (VAP 91,34 ± 1,14 µm/s; VSL 79,77 ± 0,83 µm/s e VCL 137,62 ± 3,52 µm/s). Desta forma, pode-se observar que após a centrifugação houve um percentual de perda de 15,13% para VAP, 12,47% para VSL e 20,53% para VCL. Não foi encontrada diferença (P>0,05) entre taurinos e zebuínos para as velocidades espermáticas (Tabela 8).

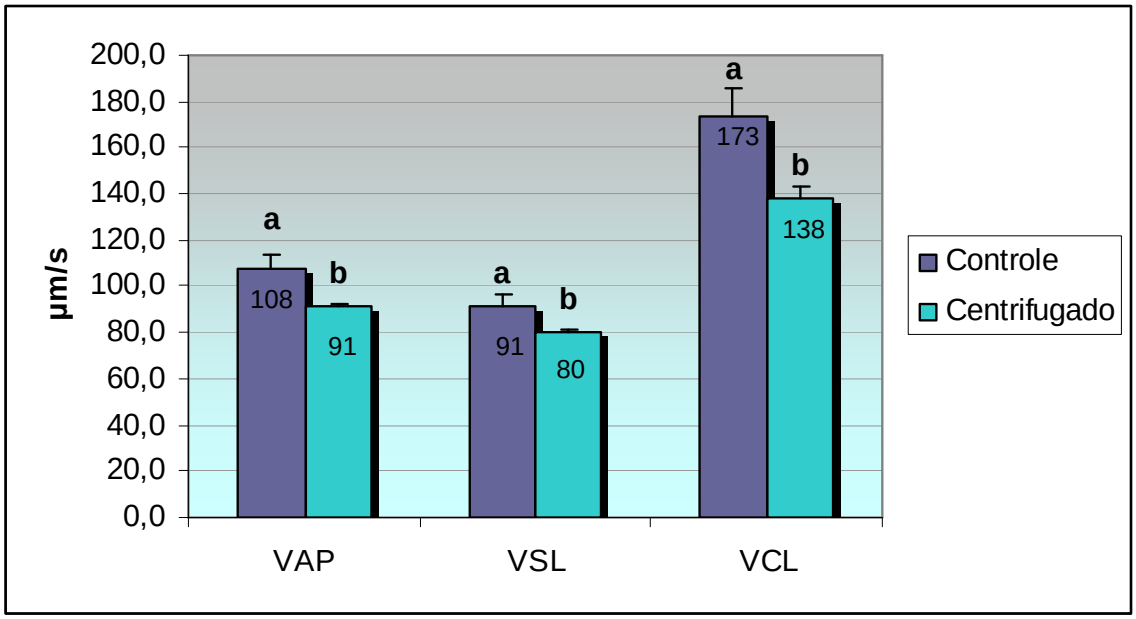
Tabela 8. Médias (± Erros Padrão) das velocidades de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

	VAP (µm/s) Tratamento			VSL (µm/s) Tratamento			VCL (µm/s) Tratamento		
	Controle	**Centrif**	**Total**	**Controle**	**Centrifug**	**Total**	**Controle**	**Centrifug**	**Total**
Taur	108,1± 4,9	90,9±1,6	**99,5±3,2 ^{A}**	93,2± 4,3	80,9±1,3	**87,0±2,8^{A}**	170,9±7,9	131,7±3,4	**151,3±5,6^{A}**
Zeb	107,2±8,6	91,8±1,7	**99,5±5,1^{A}**	89,1± 7,1	78,6±1,0	**83,8±4,0^{A}**	175,5±16,3	143,6±5,8	**159,5±11,0^{A}**
Total	**107,6±4,8 ^{a}**	**91,3±1,1^{b}**		**91,1± 4,1^{a}**	**79,8±0,8^{b}**		**173,2±8,9^{a}**	**137,6±3,5^{b}**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

A: Não houve diferença significativa (p>0,05). VAP:Velocidade de deslocamento real dos espermatozóides; VCL:Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL :Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta.

Na Figura 14 encontram-se ilustrados os valores da velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) obtidas pela avaliação do sistema CASA antes e após a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™.



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,01)

Figura 14. Médias da velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) estimadas pelo sistema CASA antes (Controle) e após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.

Os valores do deslocamento lateral de cabeça espermática (ALH) e da frequência de batimentos (BCF) foram diferentes entre os espermatozóides pós-descongelação e pós-centrifugação. Como pode-se observar na Tabela 9, o deslocamento lateral de cabeça espermática (ALH) foi maior (P<0,0001) nos espermatozóides Controle (6,66 ± 0,30 µm) do que nos espermatozóides Centrifugados (5,05 ± 0,20 µm). No entanto, o contrário ocorreu nos valores de BCF, sendo maiores (P<0,05) nos Centrifugados (35,93 ± 0,89 Hz) em relação aos espermatozóides Controle (33,14 ± 1,05 Hz).

Vale ressaltar ainda que para o parâmetro ALH, não houve diferença (P>0,05) entre as subespécies (5,55 ± 0,25 µm para taurinos e 6,17 ± 0,35 µm para zebuínos), diferente do que ocorreu para o parâmetro BCF, onde encontrou-se diferença estatística (P<0,01) entre taurinos (36,76 ± 0,79 Hz) e zebuínos (32,30 ± 1,01 Hz) como também pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Médias (± Erros Padrão) do deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimentos (BCF) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

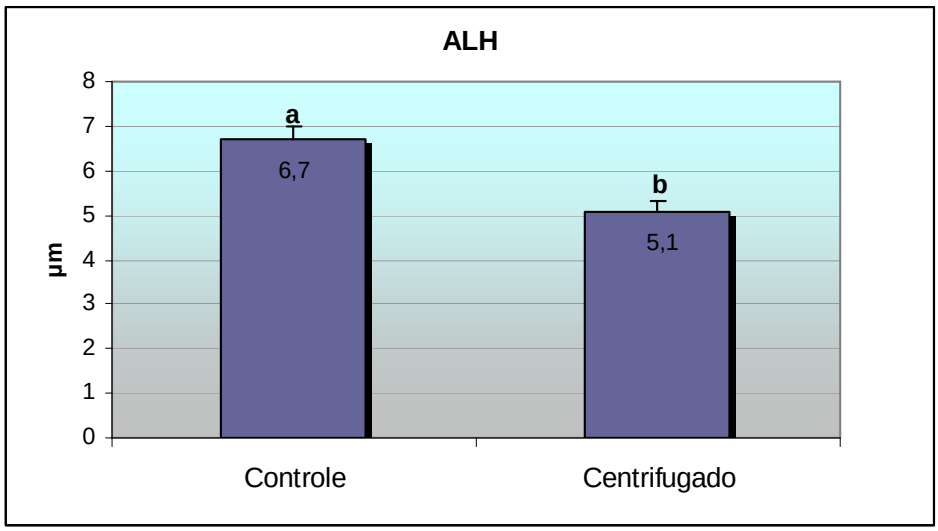
	ALH		ALH	BCF		BCF
Animal	**Tratamento**			**Tratamento**		
	Controle	**Centrifug**	**Total(µm)**	**Controle**	**Centrifug**	**Total (Hz)**
Taurinos	6,5 ± 0,3	4,6 ± 0,2	**5,5±0,3^{A}**	35,4 ± 1,2	38,2 ± 0,9	**36,8±1,1^{A}**
Zebuínos	6,9 ± 0,6	5,5 ± 0,3	**6,2±0,5^{A}**	30,9 ± 1,5	33,7 ± 1,3	**32,3±1,4^{B}**
Total	**6,7 ± 0,3^{a}**	**5,1 ± 0,2^{b}**		**33,1 ± 1,0^{a}**	**35,9 ± 0,9 ^{b}**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05)

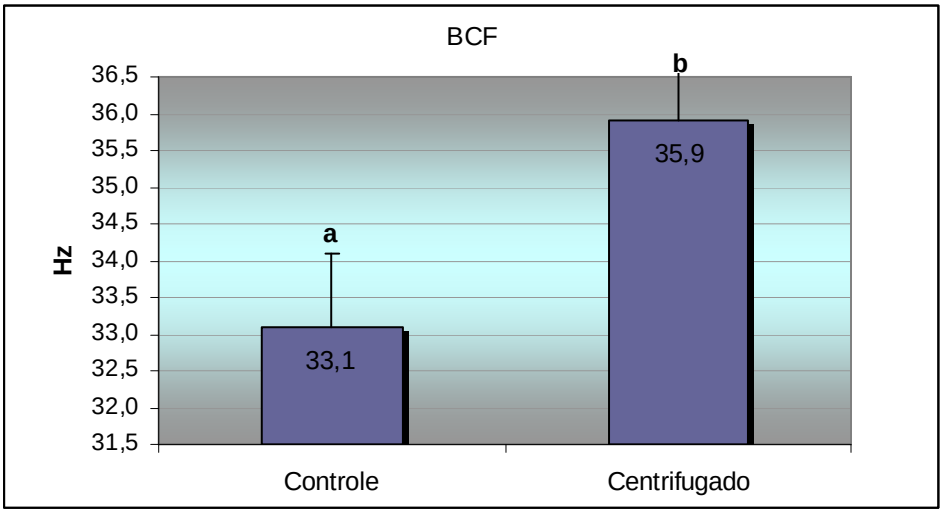
ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Freqüência de batimento.

Nas Figuras 15 e 16 estão ilustrados, respectivamente, a diminuição dos valores do deslocamento lateral de cabeça espermática (ALH) e o aumento nos valores da frequência de batimentos (BCF) nos espermatozóides do grupo Centrifugado em relação aos do grupo Controle.



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,0001)

Figura 15. Médias do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH) estimado pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,05)

Figura 16. Médias da frequência de batimentos espermáticos (BCF) estimado pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™.

Na Tabela 10 estão demonstrados os resultados da retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e na Tabela 11 os resultados do percentual de células com movimento rápido (RAPID), também obtidos na avaliação computadorizada do sêmen (CASA). Os espermatozóides que sofreram o processo de centrifugação apresentaram maiores valores (P<0,01) para STR (87,38 ± 0,72%), LIN (61,38 ± 1,44%) e RAPID (82,94 ± 1,78%) do que os espermatozóides controle (STR= 84,37 ± 0,75%; LIN= 55,52 ± 1,23% e RAPID= 66,17 ± 1,80%). É importante notar que dentre estes parâmetros avaliados, apenas na avalaliação da retilinearidade (STR) foi observada diferença estatística (p<0,05) em relação às subespécies bovinas (Tabela 10), onde o sêmen de animais taurinos apresentaram índices mais altos (86,98 ± 0,72%) do que o sêmen de animais zebuínos (84,77 ± 0,81%).

Tabela 10. Médias (± Erros Padrão) de retilinearidade (STR) e de linearidade (LIN) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

	STR		**STR**	**LIN**		**LIN**
Animal	**Tratamento**			**Tratamento**		
	Controle	**Centrifug**	**Total (%)**	**Controle**	**Centrifug**	**Total (%)**
Taurinos	85,1 ± 0,9	88,9 ± 0,8	**87,0±1,0^{A}**	56,1 ± 1,1	64,2 ± 1,5	**60,1±1,3^{A}**
Zebuínos	83,6 ± 1,2	85,9 ± 1,0	**84,8±1,1^{B}**	54,9 ± 2,2	58,6 ± 2,2	**56,8±2,2^{A}**
Total (%)	**84,4 ± 0,7 ^{a}**	**87,4± 0,7 ^{b}**		**55,5 ± 1,2^{a}**	**61,4 ± 1,4^{b}**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05)

LIN – Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático.

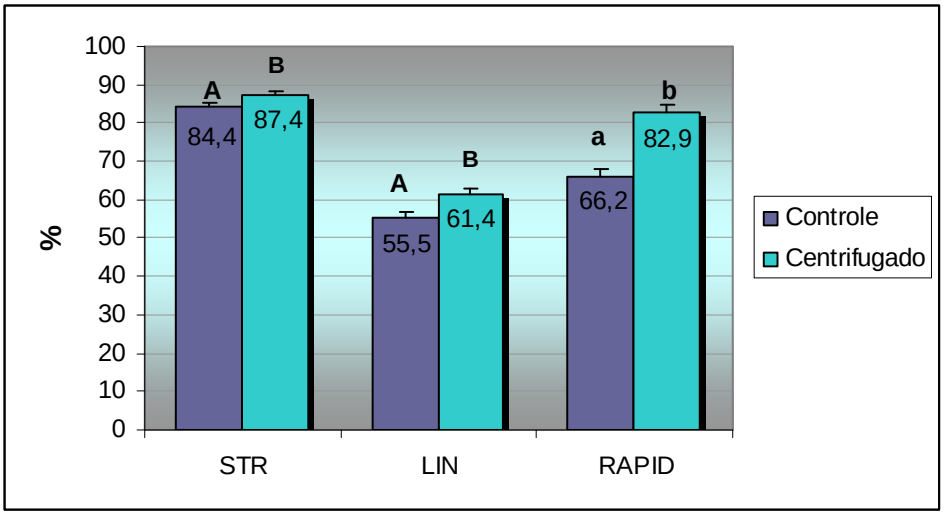
Tabela 11. Médias (± Erros Padrão) do percentual de células com movimento rápido (RAPID) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	RAPID Tratamento		RAPID
	Controle	Centrifugado	Total (%)
Taurinos	65,6 ± 2,5	84,8 ± 2,5	**75,2 ± 2,5** [A]
Zebuínos	66,7 ± 2,7	81,1 ± 2,5	**73,9 ± 2,6** [A]
Total (%)	**66,2 ± 1,8** [a]	**82,9 ± 1,8** [b]	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A: Não houve diferença significativa (p>0,05). RAPID - Células com velocidade rápida.

Na figura 17 encontram-se ilustrados o aumento nas médias da Linearidade (LIN), do índice retilíneo do movimento espermático (STR) e das células com velocidade rápida (RAPID) nos espermatozóides que foram centrifugados em relação aos espermatozóides descongelados (Controle).



Barras com letras maiúsculas diferentes indicam P<0,01 e barras com letras minúsculas diferentes indicam P<0,0001.

Figura 17. Médias da Linearidade (LIN), Índice retilíneo do movimento espermático (STR) e das células com Velocidade Rápida (RAPID) estimadas pelo sistema CASA antes (Controle) e após (Centrifugado) a centrifugação em gradiente de Percoll™.

6.4. Avaliação da Integridade das Membranas Plasmática, Acrossomal e Função Mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1

A associação de sondas fluorescentes permitiu classificar as células em oito classes diferentes (CELEGHINI, 2005), de acordo com a integridade da membrana plasmática (detectada por PI), integridade da membrana acrossomal (detectada por FITC-PSA) e função mitocondrial (detectada por JC-1).

Os percentuais de Membrana Plasmática Íntegra (MPI), Acrossomo Intacto (ACI) e Alto Potencial Mitocondrial (APM) detectados pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 estão apresentados na Tabela 12. A porcentagem de células MPI aumentou significativamente ($P<0,0001$) de 59,10 ± 2,20% no sêmen descongelado para 72,29 ± 2,07% no sêmen centrifugado.

O mesmo foi observado em relação a porcentagem de espermatozóides com APM, que aumentou ($P<0,01$) de 77,10 ± 2,05% no sêmen do Grupo Controle para 87,00 ± 1,69% no sêmen do Grupo Centrifugado. Desta forma, podemos observar que, no sêmen pós-centrifugação em gradiente de Percoll™, a melhora no percentual de células apresentando Membrana Plasmática Intacta foi de 13,19% e na porcentagem de células com Função Mitocondrial foi de 9,90%.

Já em relação ao percentual de espermatozóides com Acrossomo Intacto, os resultados obtidos indicam que estes diminuíram ($P<0,0001$) de 85,04 ± 1,67% (Controle) para 45,10 ± 2,20% após o processo de centrifugação, correspondendo a uma queda de 39,94%. Em relação a influência da subespécie nos resultados obtidos pela associação das sondas fluorescentes, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre taurinos e zebuínos.

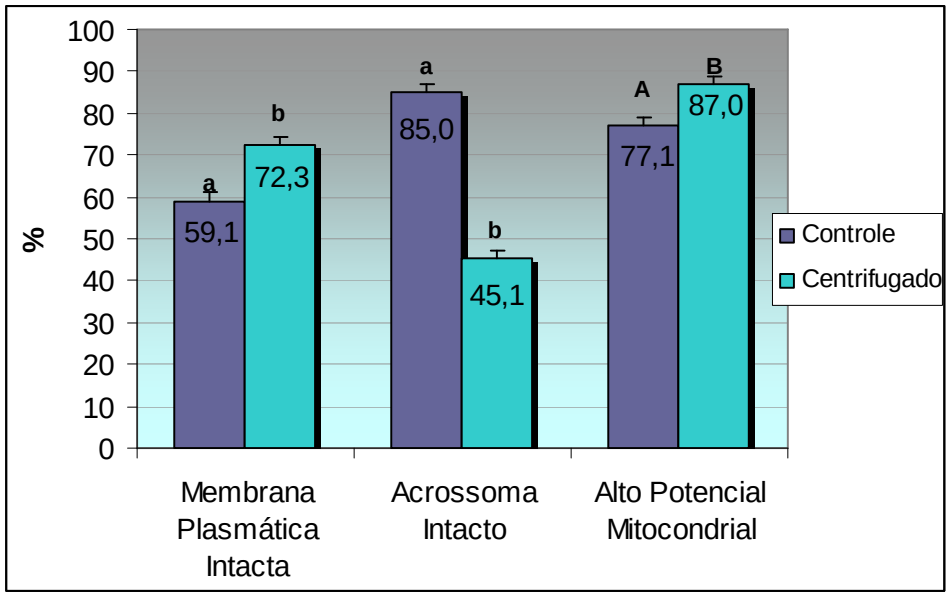
Tabela 12. Médias (± Erros Padrão) do percentual de espermatozóides apresentando Membrana Plasmática Intacta, Acrossoma Intacto e Função Mitocondrial, avaliados pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado)

	Tratamento	Membrana Plasmática Integra (%)	Acrossoma Intacto (%)	Alto Potencial Mitocondrial (%)
Total	Controle	59,10 ± 2,20 [a]	85,04 ± 1,67 [a]	77,10 ± 2,05 [a]
	Centrifugado	72,29 ± 2,07 [b]	45,10 ± 2,20 [b]	87,00 ± 1,69 [b]

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05). [2]

De acordo com estes resultados foi possível observar que o processo de centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™ aumentou os índices de células com Membrana Plasmática Intacta (P<0,0001), diminuiu o percentual de células com Membrana Acrossomal Intacta (P<0,0001) e promoveu um aumento no percentual de espermatozóides com Alto Potencial de Mitocôndrias (P<0,01), como representado na Figura 18.

[2] As tabelas completas da avaliação pela associação das sondas fluorescentes se encontram no final da dissertação (Anexo 3)

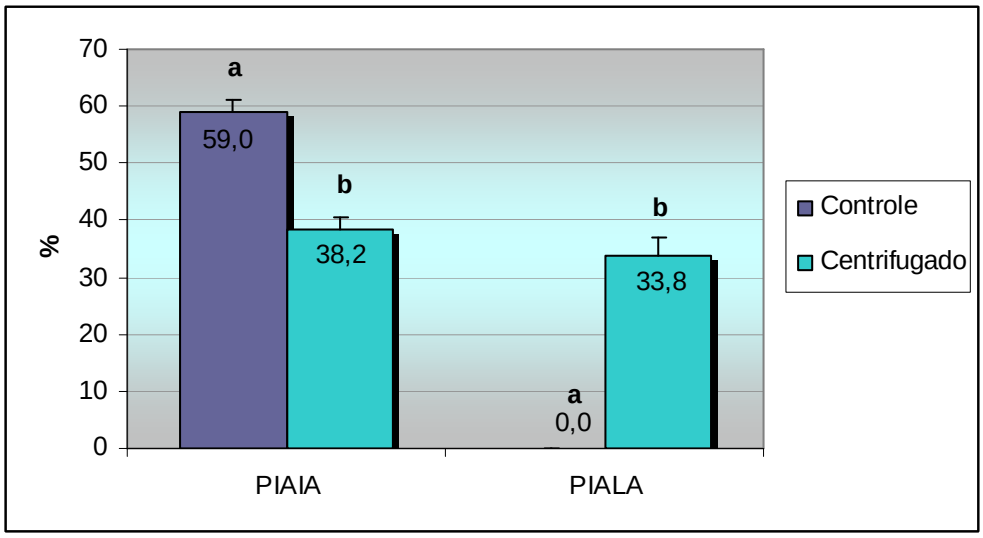


Barra com letras maiúsculas diferentes indicam P<0,01 e com letras minúsculas diferentes indicam P<0,0001.

Figura 18. Médias da Integridade da Membrana Plasmática, Acrossomal e Função Mitocondrial avaliadas pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 antes (Controle) e após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.

Os efeitos do processo de seleção do sexo espermático em gradiente de Percoll™ no sêmen descongelado puderam ser observados significativamente sobre a categoria de células que apresenta Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Intacto e Alto Potencial Mitocondrial (PIAIA) e sobre a categoria de células que apresenta Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Lesado e Alto Potencial Mitocondrial (PIALA) como mostrado na Figura 19.

No sêmen pós-descongelação, a porcentagem de células PIAIA era de 59,00 ± 2,20% e diminuiu (P<0,0001) para 38,19 ± 2,25% após a centrifugação, enquanto que e porcentagem de células PIALA aumentou (P<0,0001) de 0,00 ± 0,00% no sêmen descongelado (Controle) para 33,81 ± 3,22% no sêmen centrifugado. Assim, o sêmen que sofreu o processo de centrifugação apresentou menor número de células PIAIA (queda de 20,81%) e maior número de células PIALA (aumento de 33,81%) do que o sêmen descongelado.



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,0001)

Figura 19. Médias de células com Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Integro e Alto Potencial Mitocondrial (PIAIA) e de células com Membrana Plasmática Integra, Acrossoma Lesado e Alto Potencial Mitocondrial (PIALA) avaliadas pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes (Controle) e após o processo de sexagem por centrifugação (Centrifugado) em gradiente de Percoll™.

Na Tabela 13 pode-se observar os valores do percentual das células MPI, ACI e APM e das categorias de células PIAIA e PIALA obtidas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes e após o método de sexagem por centrifugação. Vale ressaltar que não houve diferença (P>0,05) entre taurinos e zebuínos em nenhuma característica espermática avaliada pela associação das sondas fluorescentes.

Tabela 13. Médias (± Erros Padrão) das categorias de células avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 antes e após centrifugação em gradiente de Percoll™, por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Subespécie	MPI (%)	ACI (%)	APM (%)	PIAIA (%)	PIALA (%)
Taurinos	66,60±2,71[a]	67,25±4,27[a]	81,04±1,24[a]	50,69±2,67[a]	15,84±4,06[a]
Zebuínos	64,79±2,34[a]	62,89±4,86[a]	83,06±1,90[a]	46,50±3,44[a]	17,98±4,31[a]

a: Não houve diferença significativa (p>0,05). PIAIA- Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial; PIALA - Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial; MPI- Total de células com membrana plasmática intacta; ACI - Total de células com membrana acrossomal intacta; APM- Total de células com alto potencial mitocondrial.

6.5. Avaliação da Taxa de Recuperação dos espermatozóides

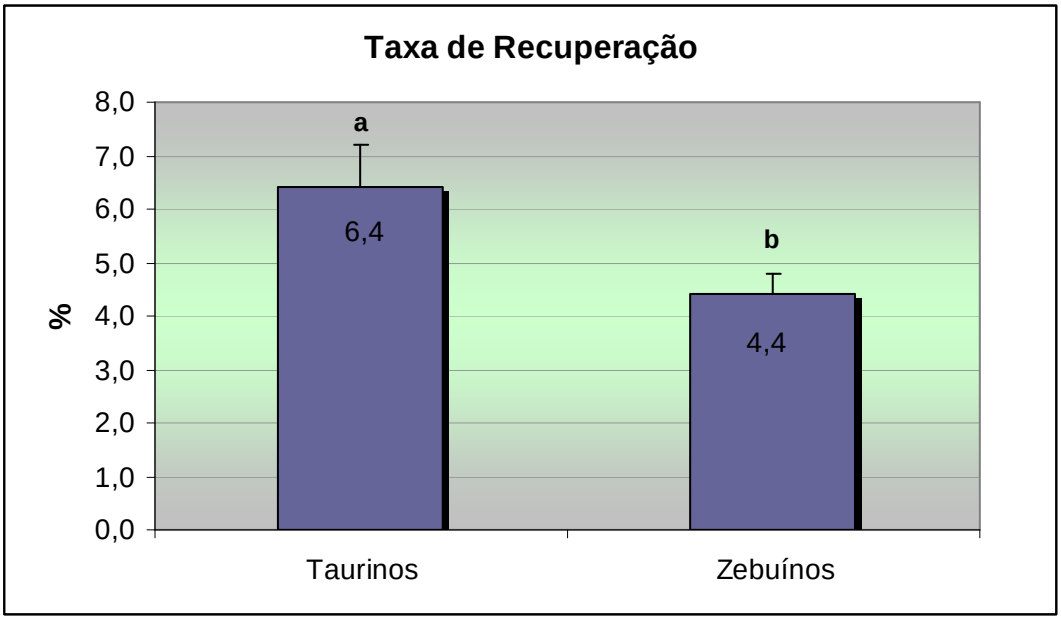
Em média, foram colocados 36,71 milhões de espermatozóides descongelados sobre cada gradiente descontínuo de densidade com motilidade visual média de 55,80% e com vigor médio 2,90. A taxa de recuperação foi calculada pela concentração espermática antes e após a centrifugação como anteriormente descrito. Após a centrifugação recuperou-se, em média, 5,50% do total de espermatozóides colocados sobre o Gradiente descontínuo de Percoll™, apresentando motilidade espermática visual, em média, de 70,00% e vigor de 3,42. Na Tabela 14 observa-se que houve diferença estatística (P<0,05) entre as subespécies bovinas para a taxa de recuperação, recuperando-se 6,54 ± 0,79% dos espermatozóides submetidos a centrifugação nos taurinos e 4,42 ± 0,43% nos zebuínos. Desta forma, foi observada uma taxa de recuperação de espermatozóides 2,1% maior nas raças Taurinas em relação as raças Zebúinas.

Tabela 14. Médias (± Erros Padrão) da taxa de recuperação dos espermatozóides centrifugados em gradiente descontínuo de Percoll™, separadas por subespécie animal (Taurinos e Zebuínos).

Taxa de Recuperação	Taurinos			Zebuínos		
	1(Ang)	2 (Hol)	3 (Jer)	4 (Gir)	5 (Guz)	6 (Nel)
Total	6,77±1,71	8,03±1,21	4,80±0,79	3,89±0,62	5,38±0, 87	3,95±0,61
	6,54 ± 0,79 [a]			4,42 ± 0,43 [b]		

a,b:Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

Na Figura 20 encontra-se ilustrada essa diferença encontrada entre subespécies na avaliação da taxa de recuperação dos espermatozóides centrifugados em gradiente descontínuo de Percoll™.



Letras diferentes sobre a barra indicam diferença significativa (P<0,05)

Figura 20. Taxa de recuperação dos espermatozóides após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™ nas subespécies Taurinas e Zebuínas.

7. DISCUSSÃO

A aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides por centrifugação em gradiente de Percoll™ depende do estabelecimento de uma metodologia que além de ser compatível com o processo de congelação, minimize a perda de espermatozóides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

A fertilização envolve um processo complexo (OURA & TOSHIMORI, 1990) e as células espermáticas precisam ser capazes de completar sua função. Portanto, além de alcançar o local de fertilização, o espermatozóide precisa ser capaz de penetrar o oócito e ativar o desenvolvimento embrionário (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001), independente do processamento ao qual foi submetido. Assim, destaca-se a importância da higidez das membranas espermáticas e dos padrões de motilidade espermáticos, para que todo o complexo processo de fertilização ocorra com êxito.

Considera-se que a viabilidade e a função dos espermatozóides, durante a manipulação para a seleção do sexo, depende: a) do meio extracelular, particularmente de sua composição iônica; b) da manipulação e processamento do sêmen durante a execução da metodologia; c) da qualidade do sêmen antes da centrifugação.

O protocolo de sexagem executado neste trabalho visa manter, no máximo possível, a qualidade espermática (LUCIO, 2007), visto que o mesmo consiste em uma metodologia simples, prática e de fácil execução.

Além disso, de acordo com o protocolo de HOSSEPIAN DE LIMA (2005), o meio de cultura DMEM e as soluções de Percoll™ são preparadas de modo que a osmolaridade se encontre entre 290 a 330 mOsm/kg H_2O para evitar o estresse osmótico e, assim, manter a viabilidade espermática (GUTHRIE et al., 2002). Essas soluções isotônicas são compostas de partículas coloidais que permitem em uma única centrifugação, separar, na fração mais densa do tubo de centrifugação, os espermatozóides viáveis (e dentre esses maior percentual de espermatozóides X). Assim, as impurezas (partículas leves, espermatozóides imaturos e/ou anormais, células, bactérias) ficam retidas nas frações superiores (LUCIO, 2007).

No presente trabalho, utilizamos apenas doses de sêmen descongeladas para avaliação dos danos pós-centrifugação. A literatura relata que o processo de criopreservação, por si só, danifica os espermatozóides de forma ultra-estrutural, física, bioquímica ou funcional (COURNTERS et al., 1989; ÕURA & TOSHIMORI,1990; SALAMON & MAXWELL, 1995; WATSON, 1995; HOLT, 2000; CELEGHINI et al.,2008).

Por esta razão, neste experimento, é possível que alguns dos danos observados após a centrifugação não teriam ocorrido com a mesma intensidade caso tivesse sido utilizado sêmen *in natura* ao invés de sêmen descongelado. Com o decorrer da discussão específica para cada parâmetro, essa questão voltará a ser abordada quando relevante.

Um outro aspecto importante a ser considerado no presente estudo, refere-se às comparações realizadas, para todos os parâmetros avaliados, entre as subespécies bovinas. Visto que foram utilizadas doses de sêmen oriundas de touros de seis raças diferentes, sendo apenas um animal de cada raça, não foi avaliada a diferença entre raças. No entanto, uma vez que três dessas raças são de origem taurina, e as outras três são de origem zebuína, agrupou-se esses resultados por subespécies.

Ainda, vale ressaltar que os resultados obtidos do agrupamento por subespécies deste experimento, apesar de relevantes, não devem ser conclusivos, visto que três animais não expressam a real população dessas subespécies. Além disso, por se tratar de um número pequeno de animais, determinada subespécie pode ter sido beneficiada ou prejudicada por um único indivíduo. Resultados mais fidedignos serão obtidos quando houver a possibilidade prática e financeira de aumentar o número de animais por raça e por subespécie testados. Assim, nas avaliações em que foram observadas diferenças significativas entre taurinos e zebuínos, será discutida a influência da subespécie no resultado obtido.

Ainda, neste experimento, utilizamos apenas sêmen congelado em gema de ovo (dado fornecido pela central) de forma a eliminar o efeito do diluidor nos resultados obtidos, visto que o uso de diluidores com diferentes componentes pode influenciar positivamente ou negativamente na avaliação espermática pós-descongelação (ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005).

A motilidade espermática é uma das principais características associadas com a capacidade fertilizante do sêmen, sendo reconhecida há muito tempo como essencial para o transporte do espermatozóide através do trato reprodutivo da fêmea e para a fertilização (JANUSKAUSKAS et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2002).

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que a centrifugação em gradiente de Percoll™ selecionou os melhores espermatozóides, observando-se as amostras centrifugadas com maior percentual de células com motilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por estudos realizados com centrifugação de sêmen descongelado em gradientes de Percoll™ (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007), onde também observou-se significativa melhora nos percentuais de motilidade progressiva após a centrifugação em Percoll™ para separação dos espermatozóides X. LUCIO (2007) observou motilidade média de 63,7% no grupo descongelado, que aumentou para 80,0% no grupo centrifugado, PERINI (2007) observou média de motilidade de 62% no grupo descongelado e de 72,0% no grupo centrifugado e RESENDE (2007) observou média de motilidade de 63,5% no grupo descongelado e de 77,7% após a centrifugação.

Apesar de subjetiva, esta avaliação pode fornecer indiretamente uma idéia da funcionalidade da célula espermática (MALMGREN, 1997). CELEGHINI (2005) observou diminuição da motilidade espermática avaliada visualmente após a congelação e descongelação. De acordo com LUCIO (2007), a centrifugação em gradiente de densidade aumenta a seleção de espermatozóides mais ativos, o que pode ser confirmado pelo aumento na motilidade espermática observado após a centrifugação.

Em concordância ao observado na avaliação visual da motilidade do presente experimento, os percentuais de motilidade total e progressiva detectados pelo CASA também aumentaram consideravelmente após a centrifugação do sêmen. VERSTEGEN et al. (2002) relatam que variações na avaliação subjetiva da motilidade progressiva de um mesmo ejaculado podem variar mais ou menos de acordo com a habilidade do técnico. No presente experimento, a avaliação visual subestimou em torno de apenas 5% a motilidade progressiva e não apresentou diferença quanto ao resultado final.

Semelhante à motilidade, houve melhora no vigor após a centrifugação, como também relatado por outros autores (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007). A causa atribuída a este fato também pode estar relacionada à propriedade inerente ao Percoll™ de selecionar as melhores células. Outro fator que pode ter contribuído para esse resultado, é a presença de substratos presentes no meio de Percoll™ (glicose por exemplo) que poderiam vir a estimular os espermatozóides presentes na amostra, conferindo-lhes mais energia.

O aumento na porcentagem de alterações morfológicas (espermatozóides anormais) presentes no ejaculado, correlaciona-se diretamente com a diminuição da fertilidade (GRAHAM, 1996; VERSTEGEN et al., 2002). Foi relatado que a criopreservação promove um aumento nas anormalidades espermáticas em diversas espécies, como demonstrado em equinos (ARRUDA, 2000), em humanos (O´CONNEL et al., 2002) e em bovinos (CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2007).

No presente experimento, após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™, observou-se diminuição da porcentagem de Defeitos Maiores, observando-se assim, um benefício que esta metodologia oferece à qualidade do sêmen descongelado. Isto também se deve, provavelmente, à propriedade de selecionar células melhores, atribuída ao Pecoll™, fazendo com que as células anormais e impurezas fiquem retidas nas frações superiores do gradiente (LUCIO, 2007), como anteriormente descrito. Desta forma, as células espermáticas morfologicamente anormais ficariam retidas no sobrenadante do gradiente, sendo recuperados, em sua maioria, espermatozóides normais.

No entanto, contraditoriamente, observou-se significativo aumento de Defeitos Menores. Este, por sua vez, refletiu no resultado final de Defeitos Totais, que não se modificou significativamente antes ou após a centrifugação.

O aumento de Defeitos Menores deste experimento, decorreu, especialmente, em razão do aumento acentuado do defeito Cabeça Isolada Normal. Observou-se que a média da porcentagem do defeito Cabeça Isolada Normal das doses de sêmen descongelado era 2,1%, e após a centrifugação essa média subiu para 14,3% (anexo 4). FONSECA & CHOW (1995) observaram incidência de 12% de Cabeça Isolada

Normal em sêmen de touro zebu com processo degenerativo, no entanto, segundo FERNADES & PIMENTEL (2002), os efeitos na fertilidade decorrente da elevação dos percentuais de Cabeça Isolada Normal e Gota Distal não têm sido demonstrados.

Este dado relacionado ao aumento de Cabeça Isolada Normal deste experimento se apresenta intrigante visto que, seguindo a tendência dos demais resultados, o Percoll™ deveria ter retido essas células espermáticas lesionadas como ocorreu com a maioria das demais células que apresentaram anormalidades. No entanto, uma possibilidade é que essa alteração morfológica tivesse ocorrido durante a passagem pelo gradiente da fração inferior (meio mais denso - 90% de Percoll™). Neste caso, de acordo com HOSSEPIAN de LIMA (dados não publicados), estas células lesionadas não seriam retidas.

Assim, uma possível explicação para essa ocorrência, seria a lesão mecânica causada pela centrifugação propriamente dita e/ou pelo meio Percoll™. Entretanto, não foi encontrado na literatura relatos sobre o aumento desta alteração como consequência de centrifugação em gradiente de Percoll™. Além disso, no laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP-Jaboticabal, este procedimento de sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradientes de densidades é realizado rotineiramente com sêmen descongelado (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007) e não se têm relatos da ocorrência desta alteração pós-centrifugação.

Portanto, no presente trabalho, o mais provável fator causador do aumento acentuado de Cabeça Isolada Normal, também se refere à lesão mecânica nas células espermáticas do grupo Centrifugado, porém, possivelmente ocasionado pela manipulação do técnico após a execução da metodologia de centrifugação (pipetagens após a formação do sedimento no tubo). Segundo PLATZ & SEAGER (1977) tal alteração se caracteriza como alterações secundárias, oriundas da maturação espermática no epidídimo ou decorrentes do processamento do sêmen, o que envolve desde o seu acondicionamento até a confecção do esfregaço (citado por UCHOA et al., 2002). Assim, acredita-se que as pipetagens realizadas durante a homogeneização do sêmen do grupo Centrifugado tenha colaborado para essa ocorrência.

Contudo, vale ressaltar que no presente estudo, mesmo com a elevação nas porcentagens de Defeitos Menores (de 5% para 15%) e Totais (de 18% para 21%), estes se mantiveram dentro do limite preconizado para sêmen de touros (BARBOSA et al., 2005).

Um outro achado interessante deste trabalho foi a ocorrência de diferença significativa, para Defeitos Menores e Totais, entre as subespécies bovinas. As amostras de sêmen oriundas de animais zebuínos, apresentaram maior porcentagem de Defeitos Menores e Totais que o sêmen oriundo de animais taurinos. Estes valores também foram decorrentes da maior incidência de Cabeça Isolada Normal nestas amostras de sêmen (10,0% de Cabeça Isolada Normal em taurinos e 18,7% em zebuínos).

De acordo com esses resultados, podería-se pressupor que espermatozóides de touros zebuínos foram mais sensíveis ao processamento de centrifugação e/ou manipulação realizados, em comparação aos espermatozóides de touros taurinos.

No entanto, é importante levar em consideração o número das amostras deste trabalho. Como anteriormente descrito, deve-se ter cautela ao analisar os dados agrupados por subespécie, pois, no caso de apenas um animal apresentar resultados fora do padrão, toda a subespécie acaba por ser incriminada e/ou beneficiada. Esta parece ser uma razoável explicação para esta diferença observada entre subespécies no presente trabalho, visto que, em relação aos animais zebuínos, um touro de fato apresentou resultados discrepantes em relação à incidência dessa alteração após a centrifugação (28,8%; anexo 4). Assim, se o resultado obtido para este touro em questão, fosse retirado do cálculo da subespécie zebuína, a mesma se apresentaria com 13,6% de porcentagem média para Cabeça Isolada Normal após a centrifugação, o que estaria bem mais próximo do resultado obtido pela média dos touros de origem taurina (10,0%).

Todavia, o motivo pelo qual espermatozóides de alguns touros apresentaram tamanha fragilidade, e/ou sofreram maiores danos físicos em relação à morfologia, facilitando o destacamento da cabeça de espermatozóides normais, merece maiores investigações.

Como já descrito anteriormente, foi observado aumento nos percentuais de motilidade total e progressiva detectados pelo CASA após a centrifugação do sêmen. No trabalho de CELEGHINI (2005), detectou-se diminuição nos valores de VAP, VSL e VCL após a criopreservação do sêmen bovino, bem como no sêmen de humano no trabalho de O´CONNEL et al. (2002). Visto que no presente trabalho, a centrifugação em gradiente de Percoll™ selecionou em sua maioria, as células móveis, esperava-se também um aumento nos parâmetros das velocidades. No entanto, surpreendentemente, observou-se diminuição nos valores de velocidade de deslocamento real (VAP), velocidade curvilínea (VCL) e de velocidade retilínea (VSL) após a centrifugação do sêmen bovino descongelado.

Uma possível explicação para esse achado seria a influência do meio Percoll™ presente apenas nas amostras de sêmen centrifugado, que, por ser um meio denso (Percoll™ 90%) e conter partículas coloidais, pode ter influenciado negativamente na velocidade dos espermatozóides presentes.

CELEGHINI (2005) também obteve resultados discordantes do CASA entre os diluidores testados, onde o diluidor que apresentou melhor preservação da motilidade total e pregressiva, apresentou menores velocidades espermáticas VAP, VSL e VCL. Segundo o autor, seu resultado poderia ser explicado por diferenças na densidade entre diluidores ou pela presença de partículas maiores, que poderiam interferir na velocidade espermática. Isto estaria de acordo com a suposição desta dissertação, de que a presença da sílica e do PVP no meio Percoll™ proporcionou essa diminuição nos valores de VAP, VSL e VCL no grupo Centrifugado.

De acordo com MORTIMER (1997), o aumento na viscosidade do meio externo pode alterar o padrão de movimentação dos espermatozóides, reduzindo a amplitude do movimento da onda flagelar.

Em relação ao parâmetro deslocamento lateral de cabeça (ALH), observou-se no presente trabalho que a centrifugação em Percoll™ promoveu uma diminuição nos valores de ALH. De acordo com ARRUDA (2000), um maior valor numérico de ALH se traduz em pior qualidade espermática, e desta forma, o deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide não é desejado, pois pode interferir na progressão da célula (CELEGHINI, 2005). ARRUDA (2000) e CELEGHINI (2005) relataram também

diferenças de ALH entre diluidores diferentes em equinos e bovinos, respectivamente, podendo-se atribuir uma certa vantagem a esses diluidores que apresentaram mais baixo valor de ALH.

AUGER et al. (1989) relataram grande amplitude de variação no ALH, parâmetro este citado na literatura humana como indicador do movimento de hiperativação característico da capacitação espermática. Assim, com a evolução na análise da cinética espermática pelo sistema CASA, tornou-se possível evidenciar parâmetros que poderiam indicar a hiperativação espermática (SOUSA, 2007).

A hiperativação é um processo que os espermatozóides de mamíferos exibem a medida que eles progridem no oviduto da fêmea. Este é descrito como um vigoroso, não progressivo e não linear movimento espermático ligado ao processo de capacitação e fertilização baseados em observações *in vivo* e *in vitro*. Durante a hiperativação, o padrão e vigor da trajetória espermática sofrem mudanças drásticas, caracterizadas por aumento da amplitude dos movimentos laterais da cabeça e cauda, associado a motilidade não progressiva, diminuição da frequência de batimentos flagelares, alta movimentação da curvatura flagelar e movimento circular não progressivo (VERSTEGEN et al., 2002). Segundo JANUSKAUSKAS et al. (1999), a hiperativação é o sinal de que o espermatozóide atingiu o estágio de capacitação, e esta mudança envolve, principalmente, o aumento da velocidade curvilinear.

De acordo com MARQUEZ & SUAREZ (2007), apesar dos fatores que levam a hiperativação ainda não estarem completamente elucidados, o Ca^{2+} tem demonstrado sinalizar mudanças no axonema, promovendo a transição do batimento flagelar de simétrico para assimétrico. Ainda de acordo com esses autores, o aumento do pH é um elemento chave na resposta do aumento do Ca^{2+} intraflagelar. Normalmente, a hiperativação espermática ocorre no local de fertilização, mas também pode ser exibida em espermatozóides sofrendo capacitação *in vitro*.

A capacitação provavelmente envolve alterações nas propriedades físico-químicas da membrana da cauda e da cabeça dos espermatozóides, levando a alterações flagelares (MORTIMER, 1997). Durante a capacitação, a elevação do pH pode contribuir para a ativação dos canais de Ca^{2+}, visto que a capacitação é inibida quando inibe-se a alcalinização intracelular, prevenindo a ocorrência da hiperativação

pré-matura, uma vez que previnem o aumento do Ca^{2+} intracelular (MARQUEZ & SUAREZ, 2007).

O aumento do VCL e do ALH, assim como a diminuição da LIN são indicativos da hiperativação. Tais propriedades refletem diretamente as características do movimento flagelar, havendo maior amplitude das ondulações flagelares (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUEZ & SUAREZ; 2007; SOUSA, 2007).

MARQUEZ & SUAREZ (2007) observaram, em bovinos, que a hiperativação foi estimulada dois minutos após a adição de bases fracas ou Ca^{2+} no meio. O sistema CASA detectou aumento de VCL (de 200 µm/s para média de 315 µm/s) e ALH (de 8,6 µm para média de 13 µm) e diminuição da LIN (de 57% para média de 24,5%). Assim, o estudo de MARQUEZ & SUAREZ (2007), pôde demonstrar ainda que, em meio com pH mais alto (pH 8,6), 86,3% dos espermatozóides foram hiperativados, em contraste com os 3,0% de espermatozóides hiperativados do grupo controle.

Questiona-se se a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™ poderia induzir a hiperativação das células espermáticas, uma vez que acredita-se que algumas proteínas decapacitantes seriam removidas da superfície espermática durante o processo de centrifugação. No entanto, a diminuição do ALH observado no presente experimento está relacionado negativamente com a ocorrência da hiperativação.

Em relação ao parâmetro BCF, segundo MORTIMER (1997), este indica a freqüência de batimento flagelar, e seu aumento, assim como a diminuição do ALH estariam relacionados com a capacidade do espermatozóide penetrar o muco cervical.

Acredita-se que o processo de criopreservação afete as mitocôndrias existentes na peça intermediária, prejudicando assim, a produção de ATP, o fornecimento de energia para o movimento flagelar e o valor de BCF (CELEGHINI, 2005). Portanto, a BCF mais alta para o sêmen centrifugado do que para o sêmen descongelado, observado nesta dissertação, pode sugerir que, além da metodologia selecionar as células com maior motilidade, componentes presentes no gradiente de Percoll™ poderiam agir de forma a estimular a frequência dos batimentos espermáticos.

A retilinearidade (STR) e a linearidade (LIN) apresentaram-se estatisticamente maiores para espermatozóides centrifugados do que para os descongelados, indicando melhoria destes parâmetros na qualidade seminal pós-centrifugação. O resultado da

porcentagem de células com movimentos rápidos (RAPID) após a centrifugação também foi melhor do que para o sêmen descongelado. O`CONNEL et al. (2002) verificaram menor LIN após a criopreservação do sêmen, bem como CELEGHINI (2005) e ARRUDA (2000) observaram diferenças de LIN entre os diluidores utilizados.

Acredita-se que maiores valores de STR, LIN e RAPID poderia refletir em melhor capacidade de movimentação retilínea das células espermáticas presentes na amostras, o que poderia vir a favorecer o trânsito espermático e a capacidade de fecundação do sêmen *in vivo*. Segundo ARRUDA (2000), quanto maiores forem os valores dos parâmetros STR, LIN e velocidade rápida, melhor deverá ser a qualidade espermática para o sêmen equino criopreservado. HOLT et al. (1997) encontraram correlação significativa entre linearidade espermática (LIN) e fertilidade de suínos a campo. Assim, os aumentos de STR, LIN e RAPID são mais um indicativo de que espermatozóides com melhor capacidade de fecundação são selecionados após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™.

Analisando-se os resultados do CASA obtidos na presente dissertação, antes e após a centrifugação, principalmente no que diz respeito aos parâmetros ALH, VCL e LIN, não foi possível inferir que a metodologia empregada induziu a hiperativação. De acordo com diversos autores (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUEZ & SUAREZ, 2007; SOUSA, 2007), para que se caracterize presença de células hiperativadas na amostra, é preciso que seja observado aumento do ALH e da VCL, bem como diminuição da LIN.

Na avaliação da presente dissertação, ocorreu o inverso, ou seja, espermatozóides centrifugados apresentaram significativamente menor ALH, menor VCL e maior LIN, quando comparados com as amostras de sêmen antes da centrifugação. Vale ressaltar ainda que se utilizou sêmen descongelado, fator este que poderia ter colaborado para a ocorrência da capacitação e da hiperativação espermática precoce. De acordo com PÉREZ et al. (1996), os espermatozóides ovinos no sêmen congelado demandam menor tempo para a ocorrência da capacitação *in vitro* e o fenômeno de hiperativação estaria associado à capacitação.

No entanto, provavelmente a presença de glicose e de BSA na solução estoque de Percoll™, bem como a aferição constante do pH (garantindo que o pH da solução

utilizada estivesse entre 6,9 a 7,4), impediram a alcalinização do meio, evitando por sua vez a ocorrência do influxo de Ca^{2+} intraflagelar, e portanto que a hiperativação espermática *in vitro* fosse deflagrada.

Dentre os parâmetros avaliados pelo sistema CASA, foi observada diferença entre as subespécies apenas para os parâmetros BCF e STR. Pode-se observar ainda que esses valores de BCF e STR tenderam a ser maior para todos os três touros de origem taurina em comparação aos outros três touros de origem zebuína (anexo 3). No entanto, o motivo pelo qual sêmen de animais taurinos apresentaram melhores valores nestes dois parâmetros, bem como a relevância desse achado, permanecem inexplicados.

Apesar das avaliações de concentração, motilidade e morfologia espermática serem os parâmetros clássicos de qualidade espermática, estes parâmetros tem apresentado limitações, visto que os espermatozóides não são avaliados detalhadamente quanto a integridade de seus compartimentos.

A viabilidade dos espermatozóides descongelados após a seleção do sexo por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™ foi verificada em estudos anteriores, pela coloração vital Tripan Blue/Giemsa e/ou pela PIV (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007). De acordo com LUCIO (2007) e PERINI (2007), os resultados da PIV indicaram que a centrifugação parece não causar diminuição nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. LUCIO (2007), obteve 25,9% na taxa de blastocistos do grupo controle e 27,5% no grupo centrifugado ($P>0,05$), enquanto PERINI (2007), obteve 37,3% na taxa de blastocistos do grupo controle e 35,6% no grupo centrifugado ($P>0,05$).

No presente trabalho utilizamos a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1. Apesar da maior acurácia nos resultados obtidos pela leitura em citometria de fluxo, visto que aproximadamente 10.000 células são avaliadas em menos de um minuto (PAPAIOANNOU et al.,1997; ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003), os testes pilotos realizados no início da execução do experimento, demonstraram que apenas seria possível realizar a leitura por microscopia de fluorescência.

A utilização do citômetro de fluxo para contagem das células coradas após a centrifugação em gradiente de Percoll™, revelou que a presença de partículas presente

no Percoll™, como a sílica coloidal e o PVP, se agregaram à membrana das células espermáticas, e/ou foram coradas pelas sondas fluorescentes de maneira inespecífica promovendo assim contagem e avaliação errônea pelo citômetro. A avaliação por microscopia, por sua vez, permitiu verificar a forma com que cada célula foi preenchida pelo corante e excluir da contagem estruturas não espermáticas.

No presente trabalho, a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, em que o núcleo não fluoresceu em vermelho com o PI, aumentou significativamente. A porcentagem de células com membrana plasmática lesada encontrada no sêmen centrifugado foi de 27,7%, comparado à 40,9% no sêmen descongelado.

A integridade da membrana espermática é fundamental para a preservação da capacidade fertilizante do sêmen, uma vez que é responsável por manter a estabilidade e a homeostase celular. Assim, este compartimento exerce um papel vital na sobrevivência do espermatozóide e na preservação da capacidade fertilizante do mesmo (OURA & TOSHIMORI, 1990). Portanto, a integridade da membrana plasmática pode ser considerada um indicador da viabilidade espermática (PAPAIOANNOU et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2001; BRITO et al., 2003; SILVA e GADELLA, 2006; SOUSA, 2007).

VALCÁRCEL et al. (1994), utilizando a sonda PI para avaliar a integridade da membrana plasmática, verificaram que imediatamente após a descongelação, somente 17% dos espermatozóides de carneiros apresentaram membrana plasmática intacta, sendo que 40 a 50 % destes eram móveis. Neste sentido, SALAMON & MAXWELL (1995) demonstraram que a célula espermática, mesmo estando danificada, pode ser móvel, porém, a penetração e a fertilização deste oócito seria improvável. Desta forma, considera-se que a avaliação do status do plasmalema é um confiável indicativo da porcentagem de espermatozóides vivos na amostra.

CELEGHINI (2005) também utilizou PI para avaliar lesões na membrana plasmática de espermatozóides bovinos. Este autor obteve baixas porcentagens de células com membrana plasmática intacta após a criopreservação (de 18,2 a 28,8 % dependendo do diluidor utilizado comparado com 78,1% no sêmen fresco).

Os prejuízos nas funções espermáticas observados após a congelação são, de acordo com WATSON (1995), causados por mudanças de temperatura durante o processo de resfriamento, por efeitos tóxicos de componentes presentes no meio de congelação, e por efeitos da própria descongelação, resultando em redução da fertilidade.

Neste sentido, ARRUDA et al. (2007) cita que os danos causados pela criopreservação prejudicam as funções celulares, resultando em redução da fertilidade. Dentre essas funções, a integridade da membrana espermática parece ser mais afetada, podendo exercer papel crítico na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea. De acordo com JANUSKAUSKAS et al. (2001), entre touros, a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta está positivamente correlacionada (r=0,58) com a taxa de fertilidade. CELEGHINI (2005) também observou que existem correlações entre motilidade e integridade de membrana plasmática em espermatozóides bovinos criopreservados.

O resultado de maior porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI) no sêmen pós-centrifugação (72,3%) obtido no presente trabalho, é mais um indicativo da propriedade seletiva do Percoll™ em recuperar células viáveis e melhores. Considera-se que este aumento é importante, pois aumenta-se a porcentagem de células aptas a participarem do processo de fertilização.

Resultados semelhantes em relação à integridade da membrana plasmática após a centrifugação em gradiente de Percoll™ do sêmen descongelado foram obtidos por LUCIO (2007) e RESENDE (2007). Estes autores, utilizando a coloração Azul de Tripam/Giemsa, observaram maiores porcentagem de espermatozóides vivos (ou seja, com membrana plasmática íntegra) após a centrifugação. LUCIO (2007) observou aumento de 61% do grupo controle para 79% do grupo centrifugado em Percoll™, enquanto RESENDE (2007) observou aumento de 71% para 80%.

Na presente dissertação, a melhora em MPI do grupo Centrifugado (de 59,1% para 72,3%), acompanhou a melhora observada na maioria dos outros parâmetros de qualidade espermática avaliados neste experimento (aumento das motilidades visual e computadorizada, do vigor, da freqüência de batimentos, da retilinearidade e

linearidade, bem como diminuição dos defeitos maiores e do ALH) em comparação ao grupo descongelado (Controle).

Assim, constata-se mais uma forte evidência de que grande parte dos espermatozóides inviáveis presentes no sêmen descongelado ficaram retidos nas camadas superiores do gradiente de Percoll™.

Uma das etapas chave no processo de fertilização dos mamíferos é o fenômeno da reação acrossomal. Geralmente a reação acrossomal é deflagrada pela ligação do espermatozóide com a zona pelúcida do oócito, promovendo fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática e a liberação dos conteúdos acrossomais que facilitarão a penetração espermática (JAISWAL et al.,1999). A integridade acrossomal, é portanto, um pré-requisito para adesão e ligação do espermatozóide ao oócito para que ocorra a reação acrossomal (VERSTEGEN et al., 2002) e a subsequente fertilização (OURA & TOSHIMORI, 1990; FLESCH & GADELLA, 2000).

Reações acrossomais prematuras podem gerar espermatozóides inférteis, e por isso, a avaliação da integridade acrossomal antes dos processos de reprodução assistida vem sendo cada vez mais empregada (SILVA e GADELLA, 2006). Alguns procedimentos relacionados com processamento de sêmen parecem induzir a capacitação e a reação acrossomal, ou pelo menos promover alterações semelhantes.

No presente trabalho, avaliando a integridade da membrana acrossomal pela sonda FITC-PSA, observou-se diminuição do percentual de células com acrossomo intacto (ACI) após a centrifugação em gradientes de densidade de Percoll™. Apesar do aumento do número de espermatozóides vivos detectados pela sonda PI (discutidos acima no ítem 6.4.1.), a porcentagem de espermatozóides com ACI diminuiu de 85,0% (grupo Controle) para 45,1% (grupo Centrifugado).

Esta constatação também coincide com os resultados obtidos por LUCIO (2007) que após a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™, observou aumento das porcentagens de células vivas com acrossomo lesado (72,0%), detectados pela coloração Azul de Tripam/Giemsa, comparados aos percentuais obtidos após a descongelação do sêmen (52,0%). Da mesma forma, RESENDE (2007) observou diminuição em relação aos espermatozóides com Acrossoma Intacto (VAI) após

centrifugação em gradiente contínuo de Percoll™. O autor obteve 18,5% de espermatozóides Vivos com acrossoma Intacto centrifugados no Percoll™ em comparação com o grupo controle (sêmen descongelado) que foi de 29,25%. A diminuição desta classe de espermatozóides (VAI) em amostras submetidas à centrifugação em gradiente de densidade, também foi relatada em humanos (McCANN & CHANTLER, 2000). Os autores sugeriram que o método selecionou com eficiência os espermatozóides vivos, mas promoveu capacitação espermática, deflagrando reação acrossomal precoce.

É importante ressaltar mais uma vez a relevância do fato de terem sido utilizadas apenas doses de sêmen descongelados. Os danos associados com a criopreservação parecem facilitar e/ou provocar a capacitação funcional dos espermatozóides pós-criopreservação (HOLT, 2000; CORMIER & BAILEY, 2003; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006). De acordo com diversos autores (PÉREZ et al., 1996; LU & SEIDEL,2003 e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006) o sêmen fresco requer maior período de capacitação que o sêmen congelado, que demandam menor tempo para a ocorrência da capacitação *in vitro*.

A capacitação parcial oriunda da criopreservação pode ser devido à interação com o glicerol, ao resfriamento e/ou descongelamento (LU & SEIDEL, 2003). Amostras de sêmen descongelado, por hipótese, possuiriam uma quantidade menor de fatores decapacitantes, ou mesmo, os perderia com maior facilidade (SOUSA, 2007). Concomitante à capacitação estão os fenômenos de hiperativação e de reação acrossomal (PÉREZ et al.,1996).

Neste sentido, WATSON (2000) sugere que o efeito do processo de congelação e descongelação causa danos à membrana acrossomal e/ou perda do acrossoma. Confirmando o fundamento dessas afirmações, CELEGHINI (2005) demonstrou diminuição na porcentagem de espermatozóides com acrossoma intacto, após o processo de congelação-descongelação. A detecção de espermatozóides com reação acrossomal espontânea nas amostras descongeladas expressa uma correlação negativa com os resultados de fertilidade, visto que diminui-se a proporção de espermatozóides capacitados capazes de se ligar e penetrar na Zona Pelúcida (VERSTEGEN et al., 2002).

Segundo LU & SEIDEL (2003), além do uso da heparina e de outros agentes químicos como agentes capacitantes, observa-se que modificações da osmolaridade e do pH no meio, e pré incubação espermática por um certo período, também induzem a capacitação, pelo menos parcialmente. ZINI et al. (2000) demonstraram que a utilização de touros melhores, associado à diminuição do número de centrifugações, permitiu diminuir as injúrias causadas nos espermatozóides pelos procedimentos utilizados para a retirada do diluidor após a descongelação.

Adicionalmente, de acordo com PARRISH et al. (1988), o pH estabilizado em 7,4 associado à presença de glicose preveniu a maior incidência de reação acrossomal além daquela provocada pelo processo de congelação e descongelação (citado por LUCIO, 2007). No trabalho de HOSSEPIAN de LIMA (2005), utilizando diferentes gradientes de Percoll™ e Optiprep®, a porcentagem média de espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (VAI) obtida (entre 64,6 a 85,5% comparada a 79,1% do controle) indicou que a glicose na concentração de 4,5 g/L presente no meio foi eficiente para inibir a reação acrossomal como descrito por PARRISH et al. (1998).

No entanto, no presente experimento, mesmo utilizando touros de excelente qualidade, centrifugação única e pouco intensa, pH estabilizado em torno de 6,9 a 7,4 e presença de glicose no meio, observou-se aumento do percentual de células com acrossoma danificado pela centrifugação em gradiente de Percoll™, que foi de 54,9% para o sêmen do grupo Centrifugado, muito acima do percentual detectado para o sêmen do grupo Controle que era de 15,0 % após a descongelação.

RODRIGUEZ-MARTINEZ (2006) levanta a hipótese de que centrifugações do sêmen através de gradientes de Percoll™ capacite parcialmente os espermatozóides. Com o uso de microscopia eletrônica, ARCIDIACONO et al. (1983) demonstraram que o Percoll™ poderia induzir uma desestabilização da membrana celular na região acrossomal, bem como ocorrência de vacúolos no acrossoma. Entretanto, esses resultados acima descritos são contraditórios àqueles obtidos por SLOTE et al. (1993) que demonstraram que a migração em Percoll™ de espermatozóides humanos, inibiu a reação acrossomal.

MAKKAR et al. (1999) investigaram os possíveis efeitos das partículas de sílica na membrana acrossomal, comparando a ocorrência da reação acrossomal utilizando

meios contendo sílica ou não. Os autores não observaram diferença no ´´status`` acrossomal dos espermatozóides. Assim, não foi possível concluir efeito isolado do meio Percoll™ na membrana acrossomal. HOSSEPIAN de LIMA (2005) demonstrou que os gradientes de Optiprep® e Percoll™, em temperatura mais elevadas (22° C), apresentaram-se menos nocivos à membrana e ao acrossomo do que os mesmos gradientes à 6℃, apresentando menor número de espe rmatozóides com reação acrossomal precoce. Portanto, além das condições de densidade e centrifugação, a temperatura também interfere no processo de capacitação e reação acrossomal (HOSSEPIAN de LIMA, 2005).

LUCIO (2007) associou ainda o método “swim-up” antes da centrifugação em gradiente de densidade, e observou aumento na porcentagem de espermatozóides vivos sem acrossoma (VSA), que era de 52,0% no grupo controle (59,2% após “swim-up” e 71,9% após gradiente de Percoll™) e passou a ser de 79,38% após associação (“swim-up” + Percoll™). O autor constatou que esses processos de seleção espermática mostram maior habilidade de selecionar espermatozóides vivos, mas resultaram na capacitação e reação acrossomal de um maior número de espermatozóides.

Assim, considerando os estudos acima descritos, uma possível hipótese para a diminuição de células ACI no presente trabalho (figura 17), seria o fato de ter sido utilizado sêmen descongelado, que favoreceu a ocorrência de capacitação e reação acrossomal precoce. Associado a este fato, provavelmente durante a passagem das células espermáticas pelas partículas (sílica e PVP) presentes no meio de Percoll™, ocorreu, além da retenção das impurezas (células imóveis, mortas e/ou anormais), a remoção de proteínas decapacitantes, levando ao aumento de células com reação acrossomal espontânea ou a lesões mecânicas no acrossoma. No entanto, o fenômeno hiperativação (discutido anteriormente) que também poderia ser deflagrado espontâneamente após a capacitação espermática, parece não ocorrer após a metodologia de separação da presente dissertação.

JONHSON (2000), utilizando sêmen *in natura,* demonstrou que ocorre capacitação dos espermatozóides durante a sexagem por citometria de fluxo. Neste sentido LU & SEIDEL (2003) demonstraram que espermatozóides sexados pelo

citômetro de fluxo não necessitam de pré-incubação com heparina para serem capazes de fertilizar. Portanto, de acordo com o autor, esse procedimento provavelmente leve à capacitação parcial, antes (incubação com Hoechst 33342 à 34,5℃ por 45 minutos) ou durante o processo de separação (´´laser`` e forças físicas durante a passagem pelo citômetro até o tubo de coleta) (WHEELER et al., 2006).

SCHENK et al. (1999) concluiram após uma série de experimentos que a criopreservação do sêmen sexado por citometria de fluxo resultou em menores motilidade e integridade acrossomal após a descongelação comparados ao sêmen congelado não sexado (citado por WHEELER et al., 2006). Segundo JONHSON (2000) e ZHANG et al. (2003) capacitação ocasionada pela citometria poderia ser uma vantagem para os espermatozóides que fossem utilizados imediatamente na FIV após a sexagem, dispensando a indução da capacitação espermática antes da fertilização.

Alguns resultados têm demonstrado que a integridade das membranas plasmática e acrossomal tem sido mais correlacionada com a taxa de fertilidade *in vitro* do que motilidade e morfologia (TARTAGLIONE & RITTA, 2004). No entanto, de acordo com os trabalhos de HOSSEPIAN de LIMA (2005), LUCIO (2007), PERINI (2007) e RESENDE (2007), apesar de observada a diminuição de espermatozóides vivos com acrossoma intacto após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade, os resultados das taxas de clivagem e blastocistos obtidas na FIV com estes espermatozóides, foram semelhantes às taxas obtidas no grupo controle (FIV com espermatozóides não sexados). Com estes resultados, RESENDE (2007) inferiu que a participação dos espermatozóides vivos sem acrossoma no processo de fecundação *in vitro* não pode ser descartado, como foi assinalado por JOHNSON (2000).

Com base nos resultados obtidos, podemos observar que a metodologia de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll™, apesar de danificar menos os espermatozóides, parece alterar a membrana acrossomal, principalmente nos espermatozóides que foram criopreservados. Portanto, a utilização de sêmen descongelado para a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade, só é recomendada quando os espermatozóides recuperados forem utilizados imediatamente para a PIV, pois a centrifugação acentuaria os danos acrossomais causados pelo

processo de criopreservação, apresentando-se uma limitação para a estocagem (congelação) dos espermatozóides descongelados e sexados.

A literatura relata com frequência a diminuição da motilidade espermática após a criopreservação (VALCÁRCEL et al., 1994; THOMAZ et al., 1998; ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2008). O´CONNELL et al. (2002) sugerem que a redução da motilidade após a descongelação pode ser explicada por uma deterioração da atividade mitocondrial. Assim, a análise da função mitocondrial pode oferecer uma maneira de acessar a motilidade espermática (MARCHETTI et al., 2004).

THOMAS et al. (1998) relataram que a criopreservação do sêmen bovino resultou na diminuição das células com alto potencial de membrana mitocondrial, coradas de laranja-avermelhada pelo JC-1. O´CONNELL et al. (2002) observaram queda de 36 a 47% na função mitocondrial avaliada por R123, após a criopreservação do sêmen humano. CELEGHINI et al. (2008) relatou, em bovinos, que a criopreservação promove queda na porcentagem de função mitocondrial para sêmen criopreservado de aproximadamente 58%, detectado por JC-1.

Na presente dissertação, a porcentagem de espermatozóides com alta função mitocondrial detectada pelo JC-1, ou seja, a porcentagem de espermatozóides que apresentaram a fluorescência vermelho-alaranjado, apresentou-se maior ($p<0,05$) no grupo Centrifugado (87,0%) do que no grupo Controle (77,1%). Ainda, este aumento na porcentagem de células com APM após a centrifugação acompanhou os resultados obtidos com as motilidades espermáticas, avaliadas tanto visual como computadorizadamente, e com o parâmetro BCF, mas não acompanharam os resultados obtidos com as velocidades espermáticas (VAP, VCL e VSL).

Neste sentido, CELEGHINI (2005) observou correlações entre motilidade e função mitocondrial em espermatozóides bovinos criopreservados. Também utilizando JC-1 em espermatozóides humano, TROIANO et al. (1998) encontraram que a quantidade de espermatozóides com baixo potencial de mitocôndrias correlacionou-se positivamente com a percentagem de células imóveis ($r = 0,52$) e negativamente com a motilidade progressiva rápida ($r=-0,55$). MARTINEZ-PASTOR et al. (2004), em espermatozóides descongelados de carneiro, encontraram correlações médias significativas entre a percentagem de células com alto potencial de membrana

mitocondrial e motilidade total (r = 0,33) e com motilidade progressiva (r = 0,40), no entanto, as correlações de alto potencial de membrana mitocondrial e VSL (velocidade progressiva), VCL (velocidade curvilinear), VAP (velocidade do trajeto) e ALH (deslocamento lateral de cabeça) foram baixas. SOUSA (2007), por sua vez, verificou baixa correlação entre motilidade e atividade mitocondrial, avaliados tanto pela sonda MITO, R-123 como por JC-1.

A média de 77,1% de espermatozóides descongelados (grupo Controle) com APM observados na presente dissertação apresentou-se bem acima do esperado. Este fato pode ser explicado não só por se tratar de doses de sêmen proveniente de central de inseminação artificial e, portanto, touros selecionados e com sêmen de qualidade satisfatória, mas principalmente porque para todos os touros dos quais as doses foram utilizadas neste experimento (exceto para o touro da raça Guzerá), a central disponibilizava doses de sêmen sexado por citometria, o que é um forte indicativo de se tratar de touros com boa qualidade de ejaculado.

Ainda assim, os resultados obtidos após a centrifugação apresentaram-se significativamente superiores aos do sêmen descongelado, resultando em valores bastante elevados para o parâmetro APM no sêmen após a centrifugação em gardiente de Percoll™ (87,0%). Mais uma vez observa-se que as melhores células, com maior competência para o batimento flagelar, e portanto, para motilidade espermática, foram selecionadas pelo gradiente de Percoll™.

A categoria de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIA) reflete, de forma mais direta, a porcentagem de células ´´viáveis`` na amostra (CELEGHINI, 2005), sendo estas as células consideradas mais aptas para o processo de fecundação. Após a centrifugação a porcentagem de células PIAIA do sêmen controle (59,0%) diminuiu para 38,2%. CELEGHINI (2005) encontrou baixos índices (em média de 16,0%) de células PIAIA após a criopreservação do sêmen bovino.

No presente trabalho, a redução nas células PIAIA deve-se à diminuição de células com acrossoma intacto. Este achado está de acordo com os achados de RESENDE (2007) que observou diminuição ($P<0,05$) da porcentagem de espermatozóides com membrana intacta e com acrossoma intacto (VAI), avaliados pela

coloração Azul de Tripam/Giemsa, de 29,2% no grupo controle (sêmen descongelado) para 18,5% após a centrifugação nos gradientes de densidade de Percoll™. O autor também observou que essa diminuição de células VAI refletiu no aumento da porcentagem de espermatozóides vivos sem acrossoma (VSA) de 41,9% para 61,7%. Esta diminuição de espermatozóides VAI e consequente aumento de espermatozóides VSA em amostras submetidas à centrifugação em gradiente de densidade, também foi relatada em estudos anteriores (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005; LUCIO, 2007).

Da mesma forma, no presente experimento, este aumento de espermatozóides corados pela FITC-PSA refletiu no aumento da categoria de células com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com função mitocondrial (PIALA). O índice de células PIALA observado neste experimento, aumentou de 0,0 % no grupo controle para 33,8% no grupo centrifugado.

De acordo com LUCIO (2007), apesar da centrifugação em gradiente de Percoll™ selecionar maior quantidade de espermatozóides vivos, ela promove reação acrossomal, visto que se observou 71,9% de espermatozóides VSA após a centrifugação em gradiente de Percoll™, em comparação à 52,0% de espermatozóides VSA do grupo de sêmen descongelado.

CELEGHINI (2005) obteve índice inferior a 0,5% para as categorias de células PIALA após a descongelação de sêmen bovino. O autor sugeriu que, talvez, a lesão do acrossomo ou mesmo a ocorrência de um processo semelhante a capacitação espermática, poderia ser seguida pela permeabilização da membrana plasmática. Assim, o período do tempo que a célula com acrossoma lesionado permaneceria com a membrana plasmática intacta seria bastante curto.

No entanto, em nosso traballho, a porcentagem de células PIALA aumentou consideravelmente, se demonstrando um achado bastante frequente após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll™.

Assim, é importante ressaltar que para se desenvolver um método para sexar espermatozóides descongelados para Inseminação Artificial, deve-se levar em conta a porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto (presença de acrossoma íntegro) já que essa classe é muito importante para o processo de fecundação (LUCIO, 2007).

A taxa de recuperação dos espermatozóides submetidos à centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™, no presente experimento, foi de 5,5%. Resultados semelhantes foram obtidos por LUCIO (2007) e RESENDE (2007), onde esta taxa atingiu 4,6% e 5,7%, respectivamente. Utilizando espermatozóides *in natura,* HOSSEPIAN DE LIMA (2005) obteve maior taxa de recuperação, 12% em média.

A origem dos espermatozóides utilizados pode justificar um menor índice de recuperação, uma vez que o processo de congelação e descongelação provoca alterações físicas nestes espermatozóides (WATSON, 1995; HOLT, 2000; COURNTERS et al., 1989). Assim, o aumento da porcentagem de células espermáticas lesionadas na amostra descongelada poderia influenciar seu comportamento frente ao processo de centrifugação, visto que o gradiente de Percoll™ seleciona a passagem de células viáveis. Portanto, menores quantidades dos espermatozóides passariam no gradiente quando oriundos de amostras criopreservadas, resultando em taxa de recuperação diminuída (LUCIO, 2007).

No entanto, PERINI (2007), utilizando doses de sêmen descongelado da raça Nelore obteve taxa de recuperação de 17,4%. Uma possível explicação para a diferença no resultado deste autor em relação ao presente trabalho e aos outros estudos de centrifugação em gradiente de Percoll™ com sêmen descongelado (LUCIO, 2007; RESENDE, 2007), poderia estar relacionada a diferenças na regulação da centrífuga, visto que PERINI (2007) utilizou força de centrifugação de 1800 X *g*, a 22℃ por 20 minutos.

Mantendo-se a devida cautela em relação ao pequeno número de animais analisados por subespécies, não se pode deixar de ressaltar as diferenças entre taurinos e zebuínos observados neste experimento para a taxa de recuperação. O sêmen descongelado de touros de origem taurina apresentaram maior taxa de recuperação (6,5%) que sêmen de touros de origem zebuína (4,4%).

Segundo GARNER et al. (1983) e JOHNSON (1994) existe diferença na quantidade de DNA entre os espermatozóides X e Y , e essa diferença é maior para taurinos do que para zebuínos. Avaliando-se a diferença no conteúdo de DNA dos espermatozóides X e Y, observou-se diferença entre as subespécies bovinas, mas não entre os indivíduos da mesma raça (GARNER et al., 1983). Raças *Bos taurus*

apresentaram diferença média entre espermatozóides X e Y de 4,08%, o que diferiu estatisticamente (P<0,001) da diferença entre os espermatozóides X e Y da raça *Bos indicus* (3,73%)(GARNER et al.,1983; JOHNSON, 1994).

Este fato parece estar relacionado com diferenças físicas observadas entre os cromossomos sexuais dessas subespécies bovinas, como por exemplo, o tamanho e a diferença morfológica do cromossomo Y. Animais *Bos taurus* apresentam cromossomo Y submetracêntrico, e animais *Bos indicus*, cromossomo Y acrocêntrico (GARNER et al., 1983). Assim, essa maior recuperação espermática dos animais taurinos (figura 20), poderia ser atribuída ao fato de haver maior diferença entre os espermatozóides X e Y nos animais *Bos taurus* do que entre os espermatozóides X e Y de animais *Bos indicus*.

RESENDE (2007), apesar de avaliar apenas uma raça de cada subespécie (Gir e Jersey) também observou maior taxa de recuperação para o animal de origem taurina (7,0%) do que para o animal de origem zebuína (4,7%), no entanto, não verificou diferenças entre as raças em relação à proporção sexual. No trabalho de HOSSEPIAN de LIMA (2005), a raça não influenciou na recuperação espermática e também no desvio da proporção sexual.

7.1. Considerações finais

Mesmo com as perdas espermáticas, a taxa de recuperação em torno de 4 a 5% após a centrifugação em gradiente de densidade processa por hora mais espermatozóides que a citometria de fluxo (LUCIO, 2007). Os dados da literatura demonstram que, por citometria, é necessária uma hora para se produzir 18 milhões de espermatozóides X com pureza de aproximadamente 95% (GARNER & SEIDEL Jr., 2008) mas com viabilidade comprometida (LIBBUS et al., 1987; MORTON et al., 2007).

Utilizando-se a técnica da presente dissertação, que apresentou taxa de recuperação de 5,5%, produziu-se por cada tubo de gradiente a média de 2,01 milhões de espermatozóides a cada 20 minutos. Como cada centrifugação possuia capacidade para 48 tubos, produziría-se a cada hora aproximadamente 290 milhões de espermatozóides com pureza de 60% a 65%, porém com menores danos à viabilidade

espermática (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007). Portanto, a quantidade de doses de sêmen produzidas pode ser largamente ampliada com um investimento mais baixo (aumentando-se apenas o número de centrífugas), comparado ao investimento relacionado com a compra de mais citômetros de fluxo.

Assim, segundo LUCIO (2007), com desvio da proporção sexual para fêmeas de 62%, e taxa de blastocisto de 27,5 % obtidos no gradiente de Percoll™, é possível aumentar a intensidade de seleção e diminuir a taxa de reposição. O mesmo não ocorre para método de sexagem por citometria de fluxo, visto que a mesma, apesar de apresentar maior acuidade de seleção de espermatozóides (85 a 90%), reduz a eficiência reprodutiva devido aos danos provocados aos espermatozóides.

Até o momento, não foram encontrados na literatura, avaliações espermáticas após seleção do sexo por centrifugação no gradiente de Percoll™ tão detalhadas quanto às realizadas no presente experimento. No entanto, HOSSEPIAN de LIMA, (2005), LUCIO (2007), PERINI (2007) e RESENDE (2007) demonstraram taxas de clivagem e blastocistos, em média de 69% e 29%, respectivamente, demonstrando que em sistemas de fecundação *in vitro*, esta técnica pode ser utilizada, sem prejudicar as taxas de desenvolvimento embrionário, e aumentando os valores de motilidade progressiva e vigor (LUCIO, 2007; PERINI, 2007 e RESENDE,2007).

Ainda de acordo com esses autores, apesar da técnica de citometria de fluxo atingir acuidade de sexagem de até 87%, as taxas de blastocistos entre 10 e 31% (LU et al.,1999; WILSON et al., 2005; MORTON et al., 2007;) associada aos danos causados na expressão gênica dos mesmos (MORTON et al., 2007), acabam por produzir menos fêmeas nascidas (devido a diminuição na eficiência reprodutiva) quando comparado com a técnica de centrifugação em gradiente de Percoll™.

Analisando-se a maioria das características avaliadas nesta dissertação, pode-se observar que, o gradiente de Percoll™ de fato selecionou células melhores. No entanto, no percentual de Defeitos Menores da morfologia espermática, e no de Acrossoma Intacto da avaliação pela associação de sondas fluorescentes, observou-se efeito negativo da centrifugação sobre essas amostras de sêmen.

Contudo, vale ressaltar que os espermatozóides utilizados no presente trabalho passaram por processo de congelação/descongelação e, após isto, foram submetidos à

centrifugação nos gradiente de densidade, o que pode ter favorecido para o aumento da incidência desses dois tipos de lesão espermática decorrentes da centrifugação. Segundo RESENDE (2007), apesar da facilidade de difusão do material genético dos touros pela criopreservação do sêmen, este procedimento ainda incorre em efeitos negativos aos espermatozóides, como alterações de membrana e perda de proteínas (HAUGAN et al., 2007). Devido a isto, resultados inferiores de qualidade espermática são esperados quando se utiliza espermatozóides provenientes de criopreservação, em comparação quando com espermatozóides recém-colhidos.

Levando-se em consideração os aspectos acima citados, e associando-se os resultados da presente dissertação com os resultados da PIV demonstradas por outros trabalhos em que utilizou-se essa mesma técnica de centrifugação no sêmen descongelado (LUCIO, 2007; PERINI, 2007 e RESENDE, 2007), podemos supor que, provavelmente, estes danos (aumento da porcentagem da patologia Cabeça Isolada Normal e das células com acrossoma danificado) não interfiram nos índices de fertilidade para a produção *in vitro* de embriões.

HOSSEPIAN de LIMA (2005) obteve índices de fertilidade satisfatórios (73% de taxa de prenhez) na IA utilizando sêmen *in natura* sexado em gradiente de densidade. Entretanto, os danos observados no grupo Centrifugado (Cabeça Isolada Normal e acrossoma danificado) do sêmen descongelado, parecem ser prejudicialmente relevantes quando objetiva-se realizar a inseminação *in vivo*.

De acordo com ARRUDA (2000), embora exista essa constante busca de se desenvolverem técnicas que tenham capacidade de predizer com exatidão a fertilidade do sêmen, estas deverão, na medida do possível, ser acompanhadas por testes de fertilidade a campo.

Assim, constatada a devida importância do aprimoramento e aplicação da metodologia de sexagem por centrifugação em gradiente de densidade, estudos voltados para a utilização de sêmen sexado em gradiente de densidade na Inseminação Artificial e a avaliação de seus índices de fertilidade, bem como comparações entre a aplicação da inseminação *in vivo* de sêmen sexado descongelado e de sêmen sexado *in natura*, merecem maiores investigações.

8. CONCLUSÕES

1. Após serem descongelados e submetidos ao processo de seleção do sexo por centrifugação em gradiente de Percoll™, os espermatozóides de bovinos apresentam:

a) Melhora da Motilidade e do Vigor estimados visualmente
b) Redução dos Defeitos Maiores e aumento dos Defeitos Menores, em especial, aumento no número de cabeças isoladas normais
c) Aumento da Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Frequência de Batimentos (BCF) e de Células com Movimento Rápido (RAPID), e redução do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH) e das Velocidades (VAP, VCL e VSL), estimados pelo CASA
d) Melhora do percentual de células com Membrana Plasmática Íntegra (MPI) e com Alto Potencial Mitocondrial (APM)
e) Aumento do percentual de células com Membrana Acrossomal danificada.

2. Após o processo de centrifugação em gradiente de Percoll™, ocorre diferença significativa entre as subespécies bovinas apenas na avaliação da morfologia espermática, em que animais zebuínos apresentam maiores percentuais de Defeitos Menores e Totais que animais taurinos, e na avaliação pelo sistema CASA, em que animais taurinos apresentam maiores valores nos parâmetros STR e BCF que animais zebuínos.

3. Recupera-se em média 5,5% dos espermatozóides descongelados submetidos ao processo de sexagem por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™, e a taxa de recuperação é maior para sêmen de touros da subespécie taurina do que de para zebuína.

4. A seleção do sexo de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade não agride as células espermáticas de maneira significativa e seleciona os melhores espermatozóides presentes na amostra, devido a propriedade inerente ao meio Percoll™;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[3]

AMANN, R. P. Treatment of sperm to determine sex. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 4961,1989.

AMANN,R.P.; HAMMERSTEDT,H.P. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**,v.14, p.397–405, 1993.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology,** v. 25, p. 317-325, 2004.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestics Animals**, v. 41, n.2, p.95-97, 2006.

ANDRADE, A.F.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S.M.; RAPHAEL, C.F.; MORETTI, A.S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction Domestics Animals**, v.42, n.2, p.190-194, 2007.

ARCIDIACONO, A.; WALT, H.; CAMPANA, A.; BALERNA, M. The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa.**International Journal of Andrology**, v. 6, p. 433– 345, 1983.

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

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epiufluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, (supl), p.226-227, 2003.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, (supl), p.230-231, 2003.

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 eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p. 8-16, 2007.

AUGER, J.; RONOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology.** v. 10, p. 439-448, 1989.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. **EMBRAPA - Circular Técnica**, v.41, p.1-13, 2005.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v.28, p.235-247, 1983.

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

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

BENNET, K.J.; BOYSE, E.A. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm trated with H-Y antiserum. **Nature,** v.246, p.308-309, 1973.

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

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaermed**., v. 25, n.7/8, p. 383-391, 1973.

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

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

BRADBURY, D.A.; SIMMONS, T.D.; SLATER, K.J.; CROUCH, S.P.M. Measurement of the ADP/ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis**. Journal of immunological methods,** v.240, p.79-92, 2000.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science,** v.84(9), p.1915-1925, 2001.

BRITO, L.F.C.; BARTHA, A.D.; BILODEAU-GOESEELSB, S.; PANICHB, P.L.; KASTELICB, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina ultilizando sondas fluoresecentes**. 2005. 190f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRUDA, R.P. Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, (supl)*,* 33, p.321, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO; J.RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479–488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO; J.RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two

different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 119–131, 2008.

CENTOLA, G.M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v.36, p.1-7, 1996.

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

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

CORMIER, N. & BAILEY, J. A diferential mechanism is involved during heparin and cryopreservation induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v.69, p.177-185, 2003.

COURTENS, J.L.; EKWALL, H.; PAQUIGNON, M.; PLÖEN, L.Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing.**Journal of Reproduction and Fertility**, v.87(2), p.613-626, 1989.

CRAN, D. G. XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 475-491, 2007.

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

DUARTE, A. M; DINIZ, E. G.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; TAVARES, M.; FRANCO, R. V. R. Pregnancy rates in heifers inseminated with semen of nelore bulls sexed by flow cytometry. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 567-573, 2007.

DUCHEN, M.R.; CROMPTOM, M.; PEUCHEN, S. ; NOWICKY, A. The use of a carbocyanyne die , JC-1, to monitor changes of mitochondrial potential in isolated mammalian cells. **Journal of Physiology**, v.473, p.7, 1993.

ERICkSSON, R.P.; LEWIS, S.E.; BUTTLEY, M. Is haploid gene expression possible for sperm antigen? **Journal of reproductive immunology**, v.3, p.195-217, 1981.

FARRELL, P.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H.; DOUGLAS-HAMILTON, D. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computerassisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertility and Sterility**, v. 64, p. 208-210, 1995.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular reproduction and development**, v.32, p.23-27, 1992.

FERNANDES, C.E.; PIMENTEL, C.A. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, v.32 (5), p.829-834, 2002.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197–235, 2000.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA**, p. 30-31, 1992.

FONSECA, V.O; CHOW, L.A. Características seminais de touros zebus com degeneraçäo testicular transitória / Seminal characteristics of zebu bulls with transitory testicular impairment. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 47(5), p.707-716, 1995.

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

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p. 431-444, 2005.

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

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Biology of Reproduction,** v. 53, p. 276-284, 1995.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction Domestics Animals**, v.34, p.399-404, 1999.

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

GOLDBERG, E.H; BOYSE, E.A.; BENNET, D.; SCHEID, M.; CARSWELL, E.A. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. **Nature**, v.232, p.478-480, 1971.

GONÇALVES, F.S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação in vitro sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos**. 2006, 117f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GORDON, I. Sex Control by Sperm Separation. In **Laboratory production of Cattle Embryos**. United Kingdom: CAB International, p. 339-407, 1994.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial funtion using flow citometry. **Biology of Reproduction,** v.43, p.55-64, 1990.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinical of North American: Equine Practice,** v. 12, p. 131-47, 1996.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.5-10, 2001.

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

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

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Archiv für experimentelle Veterinärmedizin**, v.38, p.105-114, 1984.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HAUGAN, T; GRÖHN, Y. T.; KOMMISRUD, E.; ROPSTAD, E.; REKSEN, O. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, 2007.

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

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

HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.; REED, H.B.; CURNOCK, R.M. Objetively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 312-23, 1997.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science,** v. 62, p. 3-22, 2000.

HONG, C.Y.; CHAO, H. T.; TSAI, K.L.; NG, H.T. Evaluation of human sperm motility by means of trans-membrane migration method and computer assisted semen analysis: a comparasion study. **Andrologia,** v. 23, p. 7-10, 1991.

HOPPE, P.C.; KOO, G.C. Reating mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*. **Journal of reproductive immunology**, v.6, p.1-9, 1984.

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

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

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. **Processo de seleção do sexo de espermatozóides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado**. BR PI 0300604-2, 17 Jun. 2003.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 2005. 214f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozóides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, (supl), p. 219-228, 2007.

JAISWAL,B.S.; EISENBACH, M.; TUR-KASPA,I. Detection of parcial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: wich inducers and probes to use. **Molecular human reproduction**, v.5, p.214-219, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, M.G.M.; HAARD, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-58, 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology,** v.55, p.947–961, 2001.

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation mothod and staining with HOECHST 33343. **Gamete Research**, v. 17, p.203-12, 1987.

JOHNSON, L.A.; CLARKE, R.N. Sperm DNA and sex chromosome differences between teo geographical populations of the creeping vole, Microtus oregoni. **Molecular reproduction and development**, v.27, p.159-62, 1990.

JOHNSON, L.A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **Journal of animal science**, v.70, (Suppl.2), p. 8-18, 1992.

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

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

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

KANEKO, S.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. Separation of human X- and Ybearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertility and Sterility**, v. 40, n. 5, p. 661-665, 1983.

KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization. **The Journal of reproduction and development**, v. 50, p. 463-469, 2004.

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

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

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

LÓPEZ, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. **Acta veterinaria Scandinavica,** v. 40, p. 1-9, 1999.

LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL Jr., G.E. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1393-1405, 1999.

LU, K.H. & SEIDEL JR., G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v.62, p.819-830, 2003.

LUCIO, A. C. **Influência do método de separação dos espermatozóides viáveis ("swimup") na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal**. 2007, 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen a review. **Theriogenology,** v.48, p. 523-530, 1997.

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; FORMSTECHER, P.; MARCHETTI, P. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human Reproduction,** v. 19, p. 2267-2276, 2004.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca^{2+} Influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p.660–665, 2007.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal reproduction science**, v.84, p.121-133, 2004.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, fertility, and development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrossome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.755-763, 1992.

McCANN, C. T.; CHANTLER, E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 205-209, 2000.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, p.403–439, 1997.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C; RATH, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA Expression Patterns in Bovine Blastocysts After Fertilisation *In Vitro* Using Flow-Cytometrically Sex-Sorted Sperm. **Molecular reproduction and development**, v. 74, p. 931-940, 2007.

NASCIMENTO, J. ; RAPHAEL, C. F. ; ANDRADE, A. F. C. ; ALONSO, M.A. ; CELEGHINI, E. C. C. ; ARRUDA, R.P. Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

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

O'CONNELL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v.17, p.704–779, 2002.

OHNO,S.; WACHTEL, S.S. On the elimination of Y-bearing sperm. **Immununogenetics**, v.7, p.13-6, 1978

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v.122, p.105–151,1990.

PALMA, G. A.; OLIVIER, N. S.; NEUMULLER, C.h.; SINOWATZ, F. Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of *in vitro* Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced Bovine Blastocysts. **Anatomia, histologia, embryologia**, v.37, p. 67–73, 2008.

PAPAIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology.** v. 48, p. 299-312, 1997.

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

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMÄKI, H.; SAIRANEN, A.; MÄKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal reproduction science**, in press, 2008.

PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology***,* v.50, p.1211-1220, 1998.

PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 47, p. 549-558, 1996.

PERINI, A.P. **Separação de espermatozóides "X" viáveis, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na produção *in vitro* de embriões destinados a criopreservação**. 2007, 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PLATZ, C.C.; SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science,** v.27, n.6, p.1013-1016, 1977.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology,** v. 59, p. 1973-1990, 2003.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-agregate formation of corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v.30, p.4480-4486, 1991.

RESENDE, M.V. **Sexagem de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de Percoll e Optiprep**. 2007. 63f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology,** v. 60, p. 1553-1568, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment?. **Reproduction Domestic Animals**, v. 41 (Suppl.2), p. 2–10, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. & BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v.64, p.39-54, 2007.

ROSE, G.A.; WONG, A. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of albumin column method of sperm separation for sex selection. **Human reproduction**, v.13, p.146-149, 1998.

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

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.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G.; SEIDEL, Jr. GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology** 1999;52:1375–91.

SEIDEL Jr., G. E.; ALLEN, C. H.; JOHNSON, L. A.; HOLLAND, M. D.; BRINK, Z.; WELCH, G. R.; GRAHAM, J. K.; CATTELL, M. B. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 1255-1264, 1997.

SEIDEL Jr., G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z.; GREEN, R.D.; CRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407- 1420, 1999.

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

SEIDEL Jr., G.E. Economics of selecting for sex: the most important genetic tract. **Theriogenology**, v.59, p.585-98, 2003.

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

SHASTRY, P. R.; HEGDE, U. C.; RAO, S. S. Use of Ficoll-sodium metriozoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. **Nature**, v. 269, p. 58-60, 1977.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology,** v.65, p.958-978, 2006.

SLOTTE, H.; AKERLÖF, E.; POUSETTE, A. Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll inhibits, the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 349-354, 1993.

SOUSA, D.B. **Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SOUZA, N.L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados eqüinos**. 76 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

SPINACI, M.; De AMBROGI, M.; VOLPE, S.; GALEATI, G.; TAMANINI, C.; SEREN, E. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. **Theriogenology**, v. 64, p. 191-201, 2005.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computerassisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of dairy science,** v. 80, p. 1606-1612, 1997.

TARTAGLIONE, C.M. & RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology***,* v.62, p.1245-1252, 2004.

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

TELFORD, D.J.; BEARD, A.P.; FRANKS, J.R. The potential adoption and use of sexed semen in UK suckler beef production. **Livestock Production Science**, v.84, p.39-51, 2003.

THOMAS, C.A.; GANER, D.L.; DEJARNETE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinated by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A.R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v.241, p.384-393, 1998.

UCHOA,D.C.;SILVA,A.R.;CARDOSO,R.C.S.;PEREIRA,B.S.;SILVA,L.D.M. Conservação do sêmen canino a 37^{o}C em diluentes a base de água de coco. **Ciência Rural,** v.32, n. 1, p.91-95, 2002.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-89, 1994.

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal reproduction science,** v. 45, p. 299-309, 1997.

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

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

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

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

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, fertility, and development,** v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**,v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WEIGEL, K. A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **Journal of Dairy Science**, v. 87, (Suppl.), p. 120-130, 2004.

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

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

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

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science,** v. 60-61, p. 349-355, 2000.

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

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

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

10. APÊNDICES

Apêndice A (anexo1)

TALP (BAVISTER et al., 1983)

1. SOLUÇÃO DE SAIS DO TALP (para preparar 500mL)

Componentes:

NaCL 2,1g
KCL 0,935g
$NaHCO_3$.....1,05g
NaH_2PO_4.....0,025g
CaCL $2H_2O$.....0,145g
MgCL $6H_2O$.....0,04g
Hepes.....3,25g

Preparo:

- Diluir CaCL $2H_2O$ e MgCL $6H_2O$ em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Filtrar
- Manter resfriado

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS

A. SOLUÇÃO ESTOQUE (para preparar 50mL)

Componentes:

Glicose.....2,5g
Lactato de Sódio 9,25mL
Piruvato de Sódio.....70mg
Pen-Strep.....12,5ML

Preparo:

- Dissolver todos os componentes
- Aliquotar (Alíquotas de 5 mL)
- Manter em Freezer (-20℃)

B. SOLUÇÃO TRABALHO

- Colocar 45mL da solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Filtrar em filtro de 0,45 µm
- Aliquotar (Alíquotas de 300 µL)
- Manter em Freezer (-20℃)

3. PREPARO NO DIA

Componentes:

10 mL as solução de Sais de TALP
200 µL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
100mg de Soro Albumina Bovina (BSA)

Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- Ajustar o PH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45 µm

Apêndice B (anexo 2)

DILUIÇÃO E PREPARO DAS SONDAS SOLUÇÕES FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS (CELEGHINI, 2005)

IODETO DE PROPÍDIO – PI
(Sigma-Aldrich 28,707-5, frasco com 25 mg)

Solução Estoque: 25 mg/mL PI + 1,0 mL DMSO
Solução de Trabalho : 0,5 mg/mL
20 µL da Solução Estoque de PI (25mg/mL) + 980,0 µL de PBS

Obs: - *Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.*

FITC-PSA
(Sigma L-0770, frasco com 2 mg 2,0 mg)

Solução de Trabalho: 100 µg/mL
2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de Azida de Sódio 10%

Obs: - *aliquotar e manter resfriado a 4℃ e protegidas da luz.*

JC-1
(Molecular Probes, T-3168, frasco com 5 mg)
Solução Estoque: DMSO 1,53mM
Solução de Trabalho: DMSO 153 µM

Obs: - *aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.*

Apêndice C (anexo 3)

Quadros da avaliação computadorizada do sêmen (CASA)

1. Quadro das Médias (± Erros Padrão) da Motilidade Total e Progressiva da avaliação do sistema CASA antes e após centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	Motilidade Total (MT) Tratamento		MT	Motilidade Progressiva (MP) Tratamento		MP
	Controle	Centrifugado	Total (%)	Controle	Centrifugado	Total (%)
Angus	68,6±6,5	83,0±7,2		57,7±4,8	75,6±5,5	
Holandes	72,5±3,6	90,6±0,4		60,9±3,2	83,7±1,2	
Jersey	67,2±3,5	86,2±2,9		58,3±2,1	76,7±3,3	
Taurinos			**78,0±2,5 [A]**			
Total	69,4 ± 2,6	86,6±2,5		59,0±1,9	78,7±2,2	**68,8±1,9 [A]**
Gir	73,2±5,5	87,0±3,5		63,9±6,6	78,4±1,8	
Guzerá	67,3±1,3	88,7±2,3		56,2±3,1	76,8±1,5	
Nelore	70,5±5,1	74,2±3,5		58,3±4,5	64,2±3,3	
Zebuínos			**76,8±2,5 [A]**			
Total	70,3± 2,4	83,3±2,5		59,5±2,8	73,1±2,3	**66,3±2,5 [A]**
Total (%)	**69,9 ± 1,7 [a]**	**85,0 ± 1,8 [b]**		**59,2 ± 1,6 [a]**	**75,9 ± 1,7 [b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

2. Quadro das Médias (± Erros Padrão) de VAP, VSL e VCL da avaliação do sistema CASA antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos)..

	VAP (µm/s) Tratamento			VSL (µm/s) Tratamento			VCL (µm/s) Tratamento		
	Controle	Centrif	Total	Controle	Centrifug	Total	Controle	Centrifug	Total
Hol	98,0±7,0	91,9±1,1		85,2±6,9	82,9±0,7		155,4±11,4	130,2±4,3	
Jers	115,1±12,1	93,8±3,6		98,8±9,9	82,1±3,4		182,7±19,9	141,5±3,0	
Ang	111,0±3,8	87,0±2,1		95,6±4,7	77,6±1,1		174,6±5,1	123,2±6,2	
Taur									
Total	108,1± 4,9	90,9±1,6	**99,5±3,2 [A]**	93,2± 4,3	80,9±1,3	**87,0±2,8[A]**	170,9±7,9	131,7±3,4	**151,3±5,6[A]**
Gir	123,8±16,2	91,6±4,3		104,3±15,2	80,3±2,0		195,5±24,5	138,8±11,3	
Guz	79,9±7,5	89,3±2,9		68,3±6,1	76,3±1,3		123,0±14,4	131,4±9,2	
Nel	117,8±10,8	94,4±1,0		94,6±7,3	79,2±1,4		207,9±26,6	160,5±3,1	
Zeb									
Total	107,2±8,6	91,8±1,7	**99,5±5,1[A]**	89,1± 7,1	78,6±1,0	**83,8±4,0[A]**	175,5±16,3	143,6±5,8	**159,5±11,0[A]**
Total	**107,6±4,8 [a]**	**91,3±1,1[b]**		**91,1± 4,1[a]**	**79,8±0,8[b]**		**173,2±8,9[a]**	**137,6±3,5[b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

VAP:Velocidade de deslocamento real dos espermatozóides; VCL:Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática; VSL :Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática uma reta.

3. Quadro das Médias (± Erros Padrão) do deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimentos (BCF) da avaliação do sistema CASA antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

	ALH Tratamento		ALH	BCF Tratamento		BCF
Animal	**Controle**	**Centrifug**	**Total (µm)**	**Controle**	**Centrifug**	**Total (Hz)**
Angus	6,5±0,4	4,3±0,4		35,3±2,0	38,7±1,8	
Holandes	5,9±0,3	4,5±0,3		36,4±2,6	39,5±1,5	
Jersey	6,9±0,6	5,1±0,2		34,4±1,9	36,2±1,3	
Taurinos Total	6,5 ± 0,3	4,6 ± 0,2	**5,5±0,3 ^{A}**	35,4 ± 1,2	38,2 ± 0,9	**36,8±1,1 ^{A}**
Gir	7,4±0,6	5,0±0,6		30,3±2,9	36,3±2,7	
Guzerá	5,0±0,6	5,0±0,5		34,1±2,5	34,7±1,5	
Nelore	8,3±0,9	6,4±0,3		28,3±2,2	30,1±1,2	
Zebuínos Total	6,9 ± 0,6	5,5 ± 0,3	**6,2±0,5 ^{A}**	30,9 ± 1,5	33,7 ± 1,3	**32,3±1,4 ^{B}**
Total (%)	**6,7 ± 0,3 ^{a}**	**5,1 ± 0,2 ^{b}**		**33,1 ± 1,0 ^{a}**	**35,9 ± 0,9 ^{b}**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05)

ALH - Deslocamento lateral de cabeça; BCF - Freqüência de batimento.

4. Quadro das Médias (± Erros Padrão) de retilinearidade (STR) e de linearidade (LIN) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

	STR Tratamento		STR	LIN Tratamento		LIN
Animal	**Controle**	**Centrifug**	**Total (%)**	**Controle**	**Centrifug**	**Total (%)**
Angus	84,7±2,3	89,2±1,9		55,9±3,0	66,1±3,3	
Holandes	85,3±0,7	90,0±1,4		56,4±0,8	65,3±2,6	
Jersey	85,1±1,8	87,5±1,0		55,9±2,0	61,1±1,4	
Taurinos Total	85,1 ± 0,9	88,9 ± 0,8	**87,0±1,0^{A}**	56,1 ± 1,1	64,2 ± 1,5	**60,1±1,3^{A}**
Gir	84,5±1,4	88,1±2,1		56,6±2,3	61,4±3,6	
Guzerá	85,7±2,0	85,8±1,7		59,8±3,7	62,8±3,6	
Nelore	80,7±2,3	83,6±1,2		48,4±3,6	51,6±2,2	
Zebuínos Total	83,6 ± 1,2	85,9 ± 1,0	**84,8±1,1^{B}**	54,9 ± 2,2	58,6 ± 2,2	**56,8±2,2^{A}**
Total (%)	**84,4 ± 0,7 ^{a}**	**87,4± 0,7 ^{b}**		**55,5 ± 1,2 ^{a}**	**61,4 ± 1,4 ^{b}**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

A,B: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05)

LIN – Linearidade; STR - Índice retilíneo do movimento espermático.

5. Quadro das Médias (± Erros Padrão) do percentual de células com movimento rápido (RAPID) da avaliação computadorizada do sêmen (CASA) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) e por subespécie bovina (Taurinos e Zebuínos).

Animal	RAPID Tratamento		RAPID
	Controle	**Centrifugado**	**Total (%)**
Angus	65,3±6,4	81,5±7,0	
Holandes	67,5±3,9	89,1±0,5	
Jersey	64,0±3,2	83,8±3,3	
Taurinos Total	65,6 ± 2,5	84,8 ± 2,5	**75,2 ± 2,5 [A]**
Gir	70,3±5,8	85,2±3,4	
Guzerá	62,1±2,6	85,8±2,4	
Nelore	67,8±5,2	72,2±3,4	
Zebuínos Total	66,7 ± 2,7	81,1 ± 2,5	**73,9 ± 2,6 [A]**
Total (%)	**66,2 ± 1,8 [a]**	**82,9 ± 1,8 [b]**	

a,b: Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05)

RAPID - Células com velocidade rápida.

6. Quadro das Médias (± Erros Padrão) do percentual de espermatozóides apresentando Membrana Plasmática Intacta, Acrossoma Intacto e Função Mitocondrial, avaliados pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll™, por tratamento (Controle e Centrifugado) .

Subespécie	Tratamento	Membrana Plasmática Integra (%)	Acrossoma Intacto (%)	Alto Potencial Mitocondrial (%)
Taurina	Controle	58,83 ± 3,1	85,58 ± 2,5	74,04 ± 2,7
	Centrifugado	74,38 ± 3,2	48,92 ± 2,9	88,04 ± 2,6
Zebuína	Controle	59,38 ± 3,3	84,50 ± 2,3	80,17 ± 2,9
	Centrifugado	70,21 ± 2,6	41,29 ± 3,0	85,96 ± 2,2
Total	Controle	59,10 ± 2,20 [a]	85,04 ± 1,67 [a]	77,10 ± 2,05 [a]
	Centrifugado	72,29 ± 2,07 [b]	45,10 ± 2,20 [b]	87,00 ± 1,69 [b]

a,b:Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam (P<0,05).

7. Quadro das Médias (± Erros Padrão) das categorias de células avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 antes e após centrifugação em gradiente de Percoll™, separadas por subespécie animal (Taurinos e Zebuínos).

Animal	**Tratamento**	**MPI (%)**	**ACI (%)**	**APM (%)**	**PIAIA (%)**	**PIALA (%)**
Angus	Controle	58,00±6,64	83,25±6,24	71,13±7,19	58,00±6,64	0,00±0,00
	Centrifugado	67,63±7,51	48,38±2,73	82,50±6,97	39,63±2,01	27,88±9,10
Holandês	Controle	61,63±6,75	84,38±4,71	76,13±3,91	61,63±6,75	0,00±0,00
	Centrifugado	81,25±3,97	44,38±5,91	94,38±0,66	40,38±5,50	40,75±9,12
Jersey	Controle	56,88±3,44	89,13±1,82	74,88±2,87	56,63±3,38	0,00±0,00
	Centrifugado	74,25±3,07	54,00±6,11	87,25±1,09	47,88±6,62	26,38±7,08
Taurinos	**Total**	66,60±2,71[a]	67,25±4,27[a]	81,04±1,24[a]	50,69±2,67[a]	15,84±4,06[a]
Gir	Controle	67,63±3,53	89,88±2,00	86,25±5,34	67,63±3,53	0,00±0,00
	Centrifugado	75,75±4,61	35,00±5,93	87,88±3,54	29,88±4,95	45,00±9,91
Guzerá	Controle	58,88±4,63	81,63±4,99	81,00±4,36	58,50±4,61	0,00±0,00
	Centrifugado	69,38±4,40	48,00±5,41	89,13±2,53	41,38±6,44	27,88±6,15
Nelore	Controle	51,63±6,35	82,00±3,66	73,25±4,37	51,63±6,35	0,00±0,00
	Centrifugado	65,50±4,22	40,88±2,21	80,88±4,75	30,00±2,49	35,00±4,83
Zebuínos	**Total**	64,79±2,34[a]	62,89±4,86[a]	83,06±1,90[a]	46,50±3,44[a]	17,98±4,31[a]

a: Não houve diferença significativa ($p<0,05$). ** PIAIA- Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial; PIALA - Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial; MPI- Total de células com membrana plasmática intacta; ACI - Total de células com membrana acrossomal intacta; APM- Total de células com alto potencial mitocondrial.

Apêndice D (anexo 4)

Quadro descritivo da avaliação de patologias espermáticas do sêmen descongelado, antes (Controle) e após (Centrifugado) a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll™.

	Taurinos						**Zebuínos**					
Morfologia Espermática	Angus (Controle)	Angus (Centrifug)	Holandes (Controle)	Holandes (Centrifug)	Jersey (Controle)	Jersey (Centrifug)	Gir L. (Controle)	Gir L. (Centrifug)	Guzerá (Controle)	Guzerá (Centrifug)	Nelore (Controle)	Nelore (Centr)
Acrossoma	0	0	0,125	0	0,5	0	0,875	0,25	0	0	0,125	0
Gota proximal	0,75	0,125	0,25	0	1,375	0,375	0,125	0	1,625	0	1,375	0,5
Cabeça subdesenvolvida	0,125	0	0,125	0	1,75	0,375	0,375	0	0,5	0	0,75	2
Cauda enrolada na cabeça	0,375	0	0,25	0	0	0,125	0	0	0	0	1,125	1
Cabeça isolada patológica	0,25	2,375	0	0,125	0,5	2,125	0,25	2	0,5	0,25	1,25	4,5
Estreito na base	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piriforme	0,125	0	0,125	0	0,125	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça pequena anormal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contorno anormal	0,125	0	0,125	0,125	0,625	0,375	0,375	0	0,5	0	1	0,125
Pouch Formation	0,125	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0,125	0,25
Teratológico	0	0	0,125	0	0,25	0	0	0	0	0	0,125	0,25
Peça intermediária anormal	1,25	0,125	0,25	0	1	0	0,125	0	0,625	0	1,375	0,5
Fortemente dobrada	8,375	3,625	4,5	0,125	6,125	1,5	6,5	1,375	5,875	1,5	7,625	5
Dobrada com gota anexa	3,75	0,5	1,125	0	1,625	0	0,75	0	1,75	0	6	0,25
TOTAL DE DEFEITOS MAIORES	**15,25**	**6,75**	**7**	**0,375**	**13,875**	**4,875**	**9,375**	**3,625**	**11,625**	**1,75**	**20,875**	**14,375**
Cabeça delgada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça gigante ou pequena	0,375	0	0	0	0,125	0	0	0	0,25	0	0	0
Cabeça isolada normal	2,625	13,375	0,25	1,75	1,625	15	1,25	7	5,75	20,25	1,375	28,875
Cauda abaxial	0	0,125	0	0	0	0	0,125	0	0	0	0	0
Cauda dobrada	2,375	0,75	2,5	0,75	3,5	0,75	4	1,25	4,5	2,125	0,875	0,625
Gota distal	0	0	0	0	0,375	0	0	0	0	0	0,25	0
TOTAL DE DEFEITOS MENORES	**5,375**	**14,25**	**2,75**	**2,5**	**5,625**	**15,75**	**5,375**	**8,25**	**10,5**	**22,375**	**2,5**	**29,5**
Total de Defeitos Maiores	Controle	12,04		Centrifugado	4,00		Controle	13,96		Centrifugado	6,58	
Total de Defeitos Menores	Controle	4,58		Centrifugado	10,83		Controle	6,13		Centrifugado	20,04	

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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