

Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados

Recovery rate and sperm characteristics after the sex selection by centrifugation in density gradient in frozen-thawed sperm

L.Z. Oliveira¹, R.P. Arruda², E.C.C. Celeghini², A.F.C. Andrade², V.F.M. Hossepian de Lima¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, UNESP, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.
Correspondência: leticiazoccolaro@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de recuperação e as características da motilidade e morfologia espermáticas após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em sêmen descongelado de touros taurinos e zebuínos. Observou-se que 5,5% dos espermatozoides descongelados foram recuperados após a centrifugação em gradiente de Percoll[®] e que houve efeito positivo deste processo de sexagem na maioria das avaliações da qualidade espermática. Concluiu-se que, em sêmen descongelado, a centrifugação em gradiente de Percoll[®] produz, pelo menos, 290 milhões de espermatozoides sexados por hora, e que este procedimento seleciona espermatozoides com maior competência para motilidade.

Palavras-chave: bovinos, morfologia espermática, Percoll, sêmen sexado.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the recovery rate and sperm motility and morphology after the sperm sexing by density gradient centrifugation using frozen-thawed semen from taurine and zebu bulls. It was observed that 5.5% of frozen-thawed sperm were recovered after Percoll[®] gradient centrifugation and that positive effects of the sexing process was observed in most sperm parameters. It was concluded that the centrifugation in Percoll[®] gradient with frozen-thawed sperm produce around 290 million of sexed sperm cells per hour, and that this procedure selects cells with superior competence to sperm motility.

Keywords: bovine, Percoll, sexed semen, sperm morphology.

Introdução

A citometria de fluxo é a técnica de sexagem espermática que se baseia no maior conteúdo de DNA dos espermatozoides X (cerca de 4%), e esta metodologia é capaz de separar as duas populações de espermatozoides com acuidade acima de 90% (Garner, 2006; Seidel, 2007). No entanto, ela tem se demonstrado altamente dispendiosa, restrita (Hossepian de Lima, 2007; Hossepian de Lima et al., 2011) e capaz de produzir um baixo número de espermatozoides sexados por hora (Maxwell et al., 2004; Seidel, 2007).

Segundo Maxwell et al. (2004), os resultados de fertilidade com sêmen sexado por citometria de fluxo têm sugerido uma menor viabilidade no trato genital feminino comparado com espermatozoides não sexados. Ainda, estudos realizados *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo prejudica diversos parâmetros relacionados com a fertilidade como: diminuição na motilidade progressiva dos espermatozoides (Hollinshead et al., 2003; Palma et al., 2008; Blondin et al., 2009), redução da taxa de blastocistos (Guthrie et al., 2002; Palma et al., 2008; Blondin et al., 2009), alterações na expressão gênica de embriões produzidos (Morton et al., 2007), aumento da proporção de oócitos não fertilizados e redução da produção de embriões transferíveis (Peippo et al., 2009), aumento nas perdas embrionárias (Bodmer et al., 2005) e diminuição nas taxas de concepção (Hollinshead et al., 2003; Andersson et al., 2006; Garner e Seidel, 2008).

Assim, considera-se que, para a realidade de países como o Brasil, é mais interessante optar-se por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que, mesmo com menor acuidade de sexagem, permita alcançar índices satisfatórios de fertilidade em várias condições de manejo (Hossepian de Lima et al., 2011).

Em bovinos, Hossepian de Lima et al. (2003) desenvolveram um processo de separação dos espermatozoides X em gradientes descontínuos de densidade. Estes gradientes são compostos de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias de partículas coloidais (Percoll[®]) que permitem, em uma única centrifugação, separar as impurezas (espermatozoides imaturos, células e bactérias) dos espermatozoides viáveis e, dentre estes, separar os espermatozoides X dos Y.

Essa separação dos dois tipos de espermatozoides é possível quando se utiliza um gradiente com alta

resolução de densidade como o Percoll[®], por exemplo. Isto porque a diferença no conteúdo do DNA dos espermatozoides X e Y dos bovinos resulta em uma diferença de densidade de $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$. Portanto, em bovinos, espermatozoides X são 0.06% mais densos que espermatozoides Y (Windsor et al., 1993).

Utilizando-se uma metodologia bem mais simples e menos onerosa, a centrifugação em gradiente de densidade dos espermatozoides recém-colhidos foi capaz de produzir doses enriquecidas com 70% de espermatozoides X, contendo até 20×10^6 de espermatozoides totais/dose. Quando os espermatozoides foram 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., 2003, 2011; Hossepian de Lima, 2007).

Além disso, Resende et al. (2009) demonstraram que essa técnica (sexagem espermática por centrifugação em gradiente de Percoll[®]) pode ser utilizada em sêmen descongelado para produção *in vitro* de embriões. Utilizando sêmen descongelado, obteve-se menor acuidade na separação dos espermatozoides X (63%), porém as taxas de clivagem e blastocistos se mantiveram satisfatórias (71 e 24%, respectivamente).

A aplicabilidade comercial do sêmen sexado sugere o estabelecimento de um método que minimize a perda dos espermatozoides durante o processo e que não reduza o poder fecundante deles (Hossepian de Lima, 2007). Assim, estudos voltados para o aprimoramento de métodos alternativos à citometria de fluxo para sexagem espermática merecem maior atenção. Desta forma, avaliou-se a taxa de recuperação espermática após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll[®], em espermatozoides bovinos criopreservados, bem como as características da motilidade e morfologia espermáticas antes e após a centrifugação. Ainda compararam-se todas essas variáveis entre taurinos e zebuínos.

Material e Métodos

As doses de sêmen congeladas em diluidor TRIS-Gema foram adquiridas todas da mesma empresa especializada em congelação e comercialização de sêmen. Utilizaram-se doses de seis touros de diferentes raças, sendo três de raças taurinas (Angus, Holandesa e Jersey) e três de raças zebuínas (Gir, Guzerá e Nelore), e foram avaliadas quatro partidas diferentes de cada touro. As doses foram descongeladas e submetidas às avaliações das características espermáticas (taxa de recuperação, análise computadorizada do sêmen e morfologia espermática) antes (grupo-controle) e após a centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll[®] (grupo sexado).

Preparação do gradiente descontínuo de densidade de Percoll[®]

O gradiente de densidade de Percoll[®] (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) foi preparado de acordo com Hossepian de Lima et al. (2003). Uma solução estoque de Percoll[®] 90% (pH: 7,4; osmolaridade: 280-290 mOsm/kg H₂O) foi preparada diluindo-se nove partes de Percoll[®] (densidade padrão 1,130 g/mL) em uma parte (1:9, v/v) de Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, Stonehan, USA; densidade 1,058 g/mL) concentrado dez vezes (DMEM 10X), complementado com 0,01 g/L de gentamicina (GIBCO, Stonehan, USA) e 6 mM de HEPES (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). A solução de DMEM 10X foi ~~era~~ preparada diluindo-se em 100 mL de água ultrapura bidestilada do sistema Milli Q (Millipore, Billerica, USA) a quantidade de pó necessária para preparar um litro. Essa solução foi filtrada em membranas com poros de 0,22 µm e estocada a 4°C. A solução de DMEM concentrado uma vez (DMEM 1X) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante, filtrada em membranas com poros de 0,22 µm e estocada a 4°C.

As soluções de Percoll[®] com diferentes densidades foram preparadas diluindo-se, em diferentes proporções, a solução de Percoll[®] 90% no meio DMEM 1X contendo 0,3% de albumina sérica bovina (BSA, Calbiochem, Darmstadt, Germany) fração V. Desta forma, foram obtidas três soluções isotônicas de gradiente de Percoll[®] com densidades de 1,110 g/ml (solução de Percoll[®] 80%), 1,115 g/ml (solução de Percoll[®] 85%) e 1,123 g/ml (solução de Percoll[®] 90%). O gradiente descontínuo de densidade foi preparado depositando-se, em camadas, 3 ml de cada solução isotônica de Percoll[®] (Percoll[®] 90, 85 e 80%, respectivamente) em tubos cônicos de poliestireno de 15 ml (Corning, New York, USA), de modo que a camada mais densa (Percoll[®] 90%) ficava na parte inferior do tubo, e a menos densa (Percoll[®] 80%) na camada superior (Hossepian de Lima et al., 2003). Para cada partida de sêmen avaliada, foram confeccionados três tubos de gradiente descontínuo de Percoll[®].

Centrifugação e recuperação dos espermatozoides no gradiente de sexagem

Para cada partida de sêmen, dez palhetas (0,25 ml cada) foram descongeladas a 37°C, por 20 segundos, e depois homogeneizadas. Parte desta amostra foi depositada sobre os três tubos contendo o gradiente de densidade de Percoll[®] (0,5 ml de sêmen em cada tubo), e a outra parte (1,0 ml restante) foi destinada à avaliação das características espermáticas do grupo-controle. Os tubos contendo o gradiente de densidade com o sêmen descongelado foram centrifugados a 500 x g em rotor horizontal (Centrífuga refrigerada Sorvall[®] RC 33 Plus) na temperatura de 22°C, por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante dos tubos era removido. Os sedimentos contendo os espermatozoides dos três tubos (*pellets* de 100 µl em cada tubo) foram recuperados com

um pipetador automático, homogeneizados e avaliados quanto às características espermáticas do grupo sexado.
Avaliação da taxa de recuperação espermática

A taxa de recuperação espermática foi calculada a partir dos valores da concentração espermática obtidos antes e após a centrifugação. Para avaliação da concentração espermática pré-centrifugação, retirou-se uma alíquota de 20 µl do sêmen descongelado, que foi diluído em 980 µl de formol salino tamponado (diluição de 1:50). Para mensuração da concentração espermática pós-centrifugação, retirou-se uma alíquota de 20 µl do *pellet* do sêmen centrifugado, que foi diluído em 380 µl de formol salino tamponado (diluição de 1:20 em virtude de um menor número de células totais na amostra). A concentração espermática foi determinada com o emprego da câmara de Neubauer, contando-se os espermatozoides sob microscopia óptica comum, com aumento de 400X, e multiplicando-se o valor obtido pelo fator de diluição correspondente.

Após a avaliação da concentração espermática pré e pós-centrifugação, calculou-se a taxa de recuperação espermática utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TR = \left(\frac{Vf \times Cf}{Vi \times Ci} \right) \times 100$$

Sendo que: *TR* = Taxa de recuperação; *Vi* = Volume da amostra pré-centrifugação; *Ci* = Concentração espermática do sêmen descongelado antes da centrifugação; *Vf* = Volume da amostra recuperada após a centrifugação; *Cf* = Concentração espermática do *pellet* pós-centrifugação.

Análise computadorizada da motilidade espermática

A análise computadorizada do movimento espermático foi realizada pelo sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis, HTM-IVOS-Ultimate; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), pré-ajustado (*setup*) para análise de sêmen bovino. Uma alíquota do sêmen descongelado (grupo-controle Controle) era diluída em meio TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate; Bavister et al., 1983), de forma a se obter uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/ml. Em seguida, depositava-se uma alíquota de 2 µl desta amostra na lâmina de leitura (Leja[®] standard count, SC20.01.FA, 20 micron, Leja, Nieuw-Vennep, The Netherlands). Foram analisadas as seguintes variáveis: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). Seis campos foram avaliados para cada análise. Após a centrifugação (grupo sexado), realizou-se o mesmo procedimento e analisaram-se os mesmos parâmetros, no entanto, devido a uma menor quantidade total de espermatozoides presentes no sedimento, não se realizou a etapa de diluição da amostra em meio TALP.

Avaliação da morfologia espermática

Para a realização do exame de morfologia espermática, utilizou-se o sêmen diluído em formol salino tamponado antes (grupo-controle) e após a centrifugação (grupo sexado). 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 modelo 80i; Nikon, Tokyo, Japan), com aumento de 1000X. A avaliação foi realizada contando-se 200 espermatozoides por lâmina.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). As variáveis que não respeitaram as premissas estatísticas foram transformadas em arco-seno. As variáveis originais ou transformadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA 2) ao nível de significância de 5%. Para verificar se houve efeito do tratamento (controle sexado) e/ou da subespécie (taurina e zebuína), as análises basearam-se no delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2X2.

Resultados

Não foram observadas interações ($P > 0,05$) entre o tratamento (controle sexado) e a subespécie (taurina e zebuína), e, deste modo, foi possível realizar as análises dos efeitos principais em separado.

Na Tab. 1, encontram-se os valores obtidos na avaliação da taxa de recuperação espermática. Após a centrifugação, recuperou-se, em média, 5,5% do total de espermatozoides colocados sobre o gradiente de densidade e houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as subespécies bovinas.

Tabela 1. Taxa de recuperação dos espermatozoides descongelados e centrifugados em gradiente descontínuo de Percoll[®] (Médias \pm Erros-padrão).

Taxa de recuperação	Taurinos			Zebuínos		
	Angus	Holandês	Jersey	Gir	Guzerá	Nelore
%	6,8 \pm 1,7	8,0 \pm 1,2	4,8 \pm 0,8	3,9 \pm 0,6	5,4 \pm 0,9	3,9 \pm 0,6
Total	6,5 \pm 0,8 ^a			4,4 \pm 0,4 ^b		

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Na Tab. 2, verifica-se que o sêmen sexado apresentou maior ($P < 0,05$) motilidade total e progressiva, BCF, STR e LIN, que o controle. Na Tab.3, observa-se que apenas para BCF e STR houve diferença ($P < 0,05$) entre as subespécies.

Tabela 2. Características de motilidade espermática médias (\pm Erros-padrão) avaliadas por sistema computadorizado (CASA) antes e após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll[®], por tratamento (controle e sexado).

Variáveis	Controle	Sexado
Motilidade total (%)	69,9 \pm 1,7 a	85,0 \pm 1,8 b
Motilidade progressiva (%)	59,2 \pm 1,6 a	75,9 \pm 1,7 b
Frequência de batimentos (BCF; Hz)	33,1 \pm 1,0 a	35,9 \pm 0,9 b
Retilinearidade (STR; %)	84,4 \pm 0,7 a	87,4 \pm 0,7 b
Linearidade (LIN; %)	55,5 \pm 1,2 a	61,4 \pm 1,4 b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Nas Tab. 4 e 5, encontram-se os resultados da avaliação das características morfológicas, por tratamento e por subespécie, respectivamente. Na avaliação de morfologia espermática, foi constatado efeito significativo ($P < 0,05$) entre os tratamentos (controle e sexado), e somente para defeitos menores e totais houve influência ($P < 0,05$) da subespécie. Na Tab. 6, encontram-se os valores descritivos das patologias espermáticas, antes e após a centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll[®].

Tabela 4. Alterações morfológicas dos espermatozoides (Médias \pm Erros-padrão) antes e após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll[®], por tratamento (controle e sexado)

Alterações da morfologia espermática	Controle	Sexado
Defeitos maiores (%)	13,0 \pm 1,2 a	5,3 \pm 1,1 b
Defeitos menores (%)	5,4 \pm 0,9 a	15,4 \pm 2,3 b
Defeitos Totais (%)	18,4 \pm 1,4 a	20,7 \pm 3,0 a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tabela 5. Alterações morfológicas dos espermatozoides (Médias \pm Erros-padrão) após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll[®], por subespécie bovina (taurinos e zebuínos).

Alterações da Morfologia espermática	Taurinos	Zebuínos
Defeitos maiores (%)	8,0 \pm 1,2 a	10,3 \pm 1,5 a
Defeitos menores (%)	7,7 \pm 1,7 a	13,1 \pm 2,1 b
Defeitos Totais (%)	15,7 \pm 2,1 a	23,4 \pm 2,4 b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tabela 6. Médias descritivas das alterações morfológicas do sêmen descongelado antes (controle) e após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll®.

Alterações morfológicas (%)	Taurinos						Zebuínos					
	Angus		Holandes		Jersey		Gir		Guzerá		Nelore	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Acrossoma	0,0	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,9	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0
Gota proximal	0,8	0,1	0,3	0,0	1,4	0,4	0,1	0,0	1,6	0,0	1,4	0,5
Cabeça subdesenvolvida	0,1	0,0	0,1	0,0	1,8	0,4	0,4	0,0	0,5	0,0	0,8	2,0
Cauda enrolada na cabeça	0,4	0,0	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,0
Cabeça isolada patológica	0,3	2,4	0,0	0,1	0,5	2,1	0,3	2,0	0,5	0,3	1,3	4,5
Contorno anormal	0,3	0,0	0,2	0,1	0,7	0,4	0,4	0,0	0,8	0,0	1,1	0,3
Teratológico	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3
Peça intermediária anormal	1,3	0,1	0,3	0,0	1,0	0,0	0,1	0,0	0,6	0,0	1,4	0,5
Cauda fortemente dobrada	8,4	3,6	4,5	0,1	6,1	1,5	6,5	1,4	5,9	1,5	7,6	5,0
Cauda dobrada c/ gota anexa	3,8	0,5	1,1	0,0	1,6	0,0	0,8	0,0	1,8	0,0	6,0	0,3
Total defeitos maiores (%)	15,4	6,8	7,0	0,4	13,9	4,9	9,4	3,6	11,6	1,8	20,9	14,4
Cabeça gigante ou pequena	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
Cabeça isolada normal	2,6	13,4	0,3	1,8	1,6	15,0	1,3	7,0	5,8	20,3	1,4	28,9
Cauda abaxial	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cauda dobrada	2,4	0,8	2,5	0,8	3,5	0,8	4,0	1,3	4,5	2,1	0,9	0,6
Gota distal	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
Total defeitos menores (%)	5,4	14,3	2,8	2,5	5,6	15,8	5,4	8,3	10,5	22,4	2,5	29,5

Discussão

Considera-se que a viabilidade e a função dos espermatozoides, durante a manipulação para a seleção do sexo, dependem: a) do meio extracelular, particularmente de sua composição iônica; b) da manipulação e do processamento do sêmen durante a execução da metodologia; c) da qualidade do sêmen antes da centrifugação (Hossepian de Lima et al., 2003).

Segundo Maxwell et al. (2004), os métodos de manipulação do sêmen sexado antes, durante e depois do processo de sexagem têm uma importante influência na sua viabilidade e fertilidade. Na citometria de fluxo, as células são submetidas a muitos processos agressivos, incluindo alta diluição, incubação em corante nuclear, forças mecânicas durante a passagem pelo equipamento, exposição ao laser ultravioleta e alta pressão ao serem direcionadas para o tubo de coleta (Maxwell e Johnson, 1999).

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

Além disso, de acordo com o protocolo de Hossepian de Lima et al. (2003), as soluções de Percoll® são preparadas de modo que a osmolaridade se encontre entre 290 a 320 mOsm/kg H₂O para evitar o estresse osmótico e, assim, manter a viabilidade espermática (Guthrie et al., 2002). Essas soluções coloidais isotônicas de Percoll® permitem, em uma única centrifugação, separar, na fração mais densa do tubo de centrifugação, os espermatozoides viáveis (e, dentre esses, maior percentual de espermatozoides X), ficando as impurezas (espermatozoides imaturos, anormais, células, bactérias) retidas nas frações superiores (Hossepian de Lima et al., 2003).

Os dados da literatura demonstram que, por citometria de fluxo, é necessária uma hora para se produzir 18 milhões de espermatozoides X com pureza de aproximadamente 95% (Garner e Seidel, 2008), mas com viabilidade comprometida (Morton et al., 2007).

No presente trabalho, foram colocados, em média, 36,7 milhões de espermatozoides descongelados sobre cada gradiente de densidade de Percoll® com motilidade progressiva média de 59,2%. Após a centrifugação, recuperam-se 5,5% do total de espermatozoides colocados sobre o gradiente de densidade, apresentando motilidade progressiva média de 75,9%.

Utilizando-se a técnica do presente experimento, com essa taxa de recuperação de 5,5%, produzir-se-ia por tubo de gradiente a média de 2,01 milhões de espermatozoides a cada 20 minutos. Como a centrífuga tinha

capacidade para 48 tubos, seriam produzidos a cada hora aproximadamente 290 milhões de espermatozoides, com pureza de 60 a 65% (Resende et al., 2009), porém com menores danos à qualidade espermática.

A taxa de recuperação obtida neste trabalho está de acordo com os resultados alcançados por Resende et al. (2009), que obtiveram média de recuperação espermática de 6,7% após centrifugação de sêmen descongelado em gradiente de densidade de Percoll[®]. No entanto, ficou abaixo do alcançado por Hossepian de Lima et al. (2003), que, utilizando espermatozoides recém-colhidos, obtiveram taxa de recuperação média de 12% após o processo de centrifugação em gradiente de Percoll[®]. A origem dos espermatozoides utilizados no presente experimento pode justificar esse menor índice de recuperação quando se utiliza sêmen descongelado, uma vez que o processo de congelamento e descongelamento danifica os espermatozoides (Celeghini et al., 2008), levando ao aumento da quantidade de células que ficam retidas nas camadas superiores do gradiente de sexagem.

Apesar do pequeno número de animais analisados por subespécies, não se pode deixar de notar a diferença entre taurinos e zebuínos observada neste experimento, em que as amostras de sêmen descongelado de taurinos apresentaram maior taxa de recuperação (6,5%) que as amostras de sêmen de zebuínos (4,4%).

Segundo Garner et al. (1983) e Johnson (1994), a diferença na quantidade de DNA entre os espermatozoides X e Y é maior ($P < 0,05$) para taurinos (4,08%) do que para zebuínos (3,73%). 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 (Garner et al., 1983; Garner, 2006). Assim, essa maior recuperação espermática observada para sêmen de taurinos do presente trabalho poderia ser atribuída ao fato de haver maior diferença entre os espermatozoides X e Y nos animais *Bos taurus taurus* do que entre os espermatozoides X e Y de animais *Bos taurus indicus*. No entanto, é necessário um maior número de touros por subespécie para confirmar esse achado.

A motilidade espermática é reconhecida há muito tempo como essencial para o transporte do espermatozoide através do trato reprodutivo da fêmea e para fertilização (Januskauskas et al., 2001). Alguns trabalhos utilizando sêmen sexado por citometria de fluxo denotam que a separação espermática por esta metodologia diminui a motilidade espermática após o procedimento (Hollinshead et al., 2003; Palma et al., 2008; Blondin et al., 2009). Ainda, segundo Maxwell et al. (2004), os resultados inferiores de fertilidade utilizando sêmen sexado por citometria sugerem uma menor longevidade no trato reprodutivo da fêmea para o sêmen sexado do que para o sêmen não sexado.

Segundo os resultados apresentados neste experimento, observou-se que a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®] melhorou a motilidade espermática, como previamente demonstrado por Hossepian de Lima et al. (2003). O aumento, no grupo sexado, das motilidades total e progressiva detectado pelo CASA indica que a centrifugação no gradiente de densidade do presente trabalho selecionou os espermatozoides móveis do sêmen descongelado, o que se deve à propriedade do Percoll[®] de reter as impurezas (espermatozoides imóveis, imaturos, células anormais) nas frações superiores.

Segundo Mortimer (1997), o aumento da frequência de batimentos estaria relacionado com a capacidade do espermatozoide penetrar o muco cervical. Acredita-se que o processo de criopreservação afete as mitocôndrias existentes na peça intermediária, prejudicando, assim, o valor da frequência de batimentos (Celeghini et al., 2008). Portanto, uma frequência de batimentos mais alta para o sêmen sexado do que para o sêmen descongelado, observado no presente trabalho, sugere que, além de a metodologia selecionar as células com melhor motilidade, substratos presentes no meio de Percoll[®] poderiam estar conferindo energia aos espermatozoides presentes na amostra, estimulando a frequência dos batimentos espermáticos.

Também neste experimento foi observado que retilinearidade e linearidade apresentaram-se maiores para os espermatozoides sexados do que para os espermatozoides controle, o que pode ser indicativo de mais uma melhoria na qualidade seminal pós-centrifugação. Segundo Arruda et al. (2003), o aumento nas variáveis retilinearidade e linearidade pode refletir em melhor capacidade de movimentação retilínea das células espermáticas, apesar de Januskauskas et al. (2003) não encontrarem correlações entre linearidade e taxa de fertilidade em bovinos.

Dentre os parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de motilidade espermática (CASA), foram observadas diferenças entre as subespécies apenas para os parâmetros frequência de batimentos e retilinearidade. No entanto, mantendo-se a devida cautela em relação ao número de animais por subespécie deste experimento, o motivo pelo qual o sêmen dos animais taurinos apresentou melhores valores deste dois parâmetros, bem como a relevância desse achado, permanece inexplicado.

Tem sido relatado que a criopreservação promove um aumento nas anormalidades espermáticas (Celeghini et al., 2008). No presente experimento, após a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®], observou-se diminuição da porcentagem de defeitos maiores, confirmando-se mais um benefício que esta metodologia oferece à qualidade do sêmen descongelado. A propriedade atribuída ao Percoll[®], de selecionar células melhores, permitiu que as células anormais ficassem retidas nas frações superiores do gradiente.

No entanto, contraditoriamente, observou-se significativo aumento de defeitos menores após a centrifugação. O aumento de defeitos menores deste experimento decorreu especialmente em razão do aumento acentuado no número de cabeças isoladas normais. O aumento desta alteração espermática 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.

Uma possibilidade é que a necessidade de um batimento flagelar mais intenso devido à alta densidade do meio tenha provocado a quebra das ligações proteicas que mantêm a adesão entre a cabeça e o flagelo. Entretanto, não foram encontrados na literatura, nem em outros trabalhos do laboratório com sêmen descongelado, relatos sobre o aumento desta alteração como consequência de centrifugação em gradiente de Percoll[®]. Portanto, outra possível explicação seria a ocorrência de lesão mecânica nas células espermáticas do grupo sexado, porém ocasionada pela pipetagem após a formação dos sedimentos nos tubos para a homogeneização do sêmen centrifugado. Sustendo esta hipótese, Platz e Seager (1977) relatam que o defeito cabeça isolada normal pode ser decorrente do processamento do sêmen, o que pode envolver desde o seu acondicionamento até a confecção das lâminas de leitura.

Vale ressaltar, contudo, que, mesmo com a elevação nas porcentagens de defeitos menores e totais no grupo sexado do presente trabalho, estes se mantiveram dentro do limite preconizado para sêmen de touros de 20% para defeitos menores, 25% para defeitos maiores e 30% para defeitos totais (Barbosa et al., 2005).

Outro achado interessante foi a ocorrência de maior porcentagem de defeitos menores e totais após a centrifugação em gradiente de densidade em zebuínos do que em taurinos. Estes valores também foram decorrentes da maior incidência de cabeça isolada normal nestas amostras. Uma possível explicação para esta diferença observada entre as subespécies seria o fato de um touro zebuino (raça Nelore) ter apresentado uma incidência muito maior desse defeito espermático após a centrifugação (28,8%). Assim, se o resultado obtido para este touro fosse retirado do cálculo da subespécie zebuína, ela se apresentaria com 13,6% de porcentagem média de cabeça isolada normal no sêmen sexado, o que estaria bem mais próximo do resultado obtido pela média dos touros de origem taurina (10,0% de cabeça isolada normal).

A ocorrência da maior porcentagem de danos morfológicos no sêmen do Nelore do que no sêmen dos demais bovinos, após o processo de sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll[®], indica que o sêmen de alguns touros suportou menos o procedimento descrito no presente experimento. Semelhantemente, Blondin et al. (2009) sugeriram que o processo de sexagem por citometria de fluxo afetou o sêmen de alguns touros mais negativamente que o sêmen de outros touros. Todavia, o motivo pelo qual espermatozoides de alguns animais do presente experimento foram mais sensíveis ao processamento e/ou à manipulação realizados, sendo mais susceptíveis à ocorrência de danos físicos, o que facilitou o destacamento da cabeça de espermatozoides normais, instiga maiores investigações.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que, após o processo de seleção do sexo por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®], recuperam-se, em média, 5,5% dos espermatozoides descongelados submetidos ao procedimento de sexagem, o que resultaria em aproximadamente 290 milhões de espermatozoides sexados a cada hora, utilizando-se apenas uma centrífuga com capacidade para 48 tubos. Conclui-se ainda que a metodologia de sexagem do presente trabalho não agride as células espermáticas de maneira significativa, por se tratar de um meio definido e de uma metodologia bastante simples. Ainda, devido às propriedades inerentes ao Percoll[®], estas promovem efeitos favoráveis sobre a qualidade espermática das amostras descongeladas, pois selecionam as melhores células, com maior competência para o batimento flagelar e, portanto, para a motilidade espermática.

Mais pesquisas, entretanto, são requeridas para aprimorar os métodos de sexagem por centrifugação em gradiente de densidade, bem como métodos de preservação que incorporem estratégias para prevenir danos que ocorrem durante o transporte, processamento de sexagem e/ou congelação e descongelação, principalmente para o sêmen de alguns animais que produzem espermatozoides mais sensíveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e à FAPESP, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.95-97, 2006.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. *Acta Sci Vet*, v.31, p.228-229, 2003.
- Barbosa RT, Machado R, Bergamaschi MACM. A importância do exame andrológico em bovinos. *Circ Téc EMBRAPA*, n.41, p.1-13, 2005.
- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod*, v.28, p.235-247, 1983.
- Blondin P, Bealieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed



sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, p.30-38, 2009.

Bodmer M, Janett F, Hassig 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 field conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1647-1655, 2005.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.

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

Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla, Johnson LA. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.28, p.312-321, 1983.

Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, v.69, p.886-895, 2008.

Guthrie HD, Johnson LA, Garret WM, Welch GR, Dobrinsky JR. Flow cytometric sperm sorting: Effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.87-92, 2002.

Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G, Maxwell WMC. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.351-359, 2003.

Hossepian de Lima VFM. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Rev Bras Zootec*, v.36, suppl, p.219-228, 2007.

Hossepian de Lima VFM, Moreira-Filho CA, Lucio AC, Resende MV. Seleção do sexo de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. *Rev Bras Zootec*, 2011. No prelo..

Hossepian de Lima VFM, Moreira-Filho CA, Ramalho MDT. *Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado*. BR PI 0300604-2, 17 Jun, 2003.

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.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.

Johnson LA. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. *Oxf Rev Reprod Biol*, v.16, p.303-326, 1994.

Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*, v.83, p.79-95, 2004.

Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, p.1353-1362, 1999.

Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*, v.3, p.403-439, 1997.

Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WMC, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H, Wrenzycki C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.931-940, 2007.

Palma GA, Olivier NS, Neumuller Ch, Sinowatz F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol*, v.37, p.67-73, 2008.

Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Raty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymaki H, Sairanen A, Maki-Tanila A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim Reprod Sci*, v.111, p.80-92, 2009.

Platz CC, Seager SWJ. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab Anim Sci*, v.27, p.1013-1016, 1977.

Resende MV, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lucio AC, Hossepian de Lima VFM. Separation of X-Bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and Optipret density gradient: effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.581-587, 2009.

Seidel Jr GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, v.68, p.443-446, 2007.

Windsor DP, Evans G, White IG. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. *Mol Reprod Dev*, v.5, p.155-171, 1993.