UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

ANDRÉS MEJÍA GALLEGO

*Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e
funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides
bovinos sexados por citometria de fluxo*

São Paulo
2010

ANDRÉS MEJÍA GALLEGO

***Avaliação das características da motilidade (CASA),
morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST)
de espermatozóides bovinos sexados por citometria de fluxo***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

27.10.10
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2352
FMVZ

Mejía-Gallego, Andrés

Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo / Andrés Mejía-Gallego. -- 2010.
117 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Sêmen sexado. 2. Bovinos. 3. Sistema computadorizado de avaliação da motilidade. 4. Teste hiposmotico 5. Patologia espermática. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
9	1	5	Reprodução Animal	Ciencias
10	1	5	Reprodução Animal	Ciências

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Andres Mejia Gallego

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto protocolado sob o número 2038/2010, intitulado: "Avaliação das características de motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo", no qual foi utilizado sêmen congelado de diferentes subespécies bovinas e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MEJÍA-GALLEGO, Andrés

Título: Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides bovinos sexados por citometria de fluxo

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

A verdade é que, quando sua mente estava completamente alheia, ele tinha o pensamento mais estranho que qualquer lunático no mundo jamais tivera, pois lhe parecia razoável e necessário, tanto por uma questão de honra quanto para servir a nação, se tornar um cavaleiro errante e viajar pelo mundo em sua armadura e seu cavalo para buscar aventuras e envolver-se em tudo que ele havia lido sobre como os cavaleiros errantes se envolviam, aproveitando as oportunidades, colocando-se em perigo e corrigindo todo tipo de mal.

- Miguel de Cervantes, *Don Quixote*.

DEDICO.

A Dios.

A mis Papas *Ramiro* y *Alba Lucia*, su amor es la base de todas mis logros, Dios me bendijo al poder tenerlos a mi lado.

A mi hermanita *María del Pilar*, eres la otra faz de una obra de arte, tu alegría y emotividad me llenan de felicidad. No te imaginas como te admiro.

A mis abuelitas *Ruth* y *Mary*, Las abuelitas más dulces y tiernas que puedan existir, siempre las llevo en mi corazón.

A mis Abuelos *Libardo* y *Jorge (In memoriam)*, Sus vidas son una inspiración para mi. Es un honor llevar el apellido Mejia Gallego. Los Extraño

A mi novia *Dunia*, Porque nuestros sueños se hagan realidad.

LOS AMO !!!!!

Agradecimientos.

A mis tias *Angela, Nohora y Liliana*: Siempre han creído en mis capacidades, ello me ha llenado de confianza para llegar a donde estoy ahora, de todas he aprendido cosas importantes en la vida. Las llevo y las llevaré en mi corazón siempre.

A mis tios *German y Fercho*: Los tios mas parceros que se puedan tener, siempre he contado con ustedes. Gracias por ser lo que son.

A mis Tios Mejia: *Armando, Luz Marina, Ines y Normita*. A pesar de la distancia, siempre presentes.

A todos mis primos en especial a: *Natis (Arbelaez), Cos, Julian, Mauro, Cristian, Nati (Gonzales), Valenti y Juan Sebastian*. Gracias por creer en mi.

A *Juan David, Claudia, Maria, Cristian y Franco*. Gracias por ser un apoyo incondicional durante mi estadía en España.

A *Norma, Pacho, Marce y Dany*. Amigos, consejeros y aliados en mi estadía en los Estados Unidos..... Gracias por estar en los momentos difíciles.

Ao *Prof Rubens*: Lembro perfeitamente o dia que cheguei para fazer o estagio obrigatório no ano 2005, com muita dificuldade tentamos nos comunicar, mas nesse primeiro contato com o senhor, soube que aquele dia minha vida encontraria um novo rumo. A partir daí começou um grande relacionamento baseado na admiração, pelas inúmeras capacidades técnicas, científicas, didáticas, pedagógicas e sobretudo pessoais. Quando fui aceite para entrar no mestrado, soube que o senhor acreditava no meu trabalho e que a responsabilidade por receber a confiança para entrar numa das faculdades mais importantes do mundo, seria imensa. Com o dom inato que o senhor tem como educador, conseguiu identificar virtudes e deficiências profissionais e pessoais, com paciência e de uma forma desinteressada tentou fomentar e corrigir cada uma delas, fazendo que eu me convertesse no profissional e pesquisador que sou atualmente. Professor Rubens, não

sou apenas eu quem tem que agradecer, é todo um país quem agradece, porque seus ensinamentos e sua filosofia farão que minha amada Colômbia seja cada dia melhor.

Deus abençoe o senhor e a toda sua família, sempre estarão nas minhas orações.

A mi amigo y compañero *Fabian Bao Tarrago* (Paraguay). Gracias por compartir su mundo, brindarme su amistad sin conocerme y ayudarme en cada una de mis dificultades. Recuerde que es un *Parcero*.

A *Andre Furugen Cesar de Andrade*. Um exemplo de profissionalismo, sempre estive atento com cada uma de minhas questões. Obrigado por cada um dos momentos compartilhados. Desejo muita sorte na sua nova etapa da vida, você nasceu para isso.

A minhas amigas y companheiras do LBSA: *Juliana, Daniela, Fabianne e Simone*. Obrigado por fazer do dia a dia uma experiência maravilhosa, de cada uma aprendi algo diferente, sempre estarão presente no meu coração. Ju, Obrigado pela paciência no primeiro dia do meu estagio.

A *Ze Rodrigo e Milton*. Amigos e companheiros da casa do VRA, sempre me ajudaram sem nenhum interes, tiveram a paciência de escutar a minha visão de vida e compartilharam suas experiências.

A minhas companheiras, colegas e amigas do VRA: *Patrícia, Lindsay, Aline, Carol e Robertinha*. Obrigado por cada uma das conversas, momentos e espaços que a gente compartilhou. Desejo sorte a todas vocês na sua vida Profissional e Pessoal.

Ao Prof *Ed*, Prof *Mario* e Profa *Analousse* (Kiky). Pelo bom exemplo de profissionalismo e por compartilhar suas visões profissionais e pessoais.

Aos Estagiarios do CRBA: *Nara, Carol (vuvuzela), Namibia, Kleber, Enrique, Sara, Felipe, Joaquim, Carol, Rafa, Talita, Conejito, Ana Paula*. Obrigado por fazer da rotina de trabalho diária uma experiência amena e enriquecedora.

A los Pasantes Colombianos de CBRA: Leidy, Maria Alejandra, Camilo (Benito) y Felipe (Mechas). Gracias por todos los momentos compartidos, los llevo en el Corazon. *Obrigado!!*

A minha amiga *Ana Paula*. Quem estive comigo nos momentos difíceis, na ultima parte do mestrado, me ajudou a recuperar a confiança e me devolveu do mundo onde havia entrado. Obrigado por me dar um sorriso cada dia.

A meus companheiros do VNP: Bruno, Bichuca, Anahi, Ju Diniz, Bisão, Jefferson e Mineiro. Obrigado por compartilhar momentos especiais.

A toda la comunidad Colombiana e Hispana del campus de Pirassununga: Jhon, Luisa (Chiqui), Miguel, Daniel, Paola, Leonardo (Costeño), Duvan, Alejandro, Daniel (Paisa), Soraya, Paola, Lorena, Yuli, Fernando (Peru), Paulo (Chileno) . Por haber hecho de mi estadia en Pirassununga una experiencia irrepetible.

Aos funcionários do CBRA: Clayton, Edna, Marcio, João e Ze Maria. Muito Obrigado pela ajuda

A Sexing Technologies – CRV Lagoa.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

Ao programa Programa Estudantes Convenio de Posgraduação (PEC-PG) do Ministério de Educação de Brasil.

A mi amada **Colombia**. La fuente de mi Inspiración.

A todos que directa o indirectamente participaron en la realización de este proyecto. Les estoy inmensamente AGRADECIDO.....

RESUMO

MEJIA-GALLEGOS.A. **Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo.** [Assessment of Motility Characteristics (CASA) morphology; plasmatic membrane functionality (HOST) in flow cytometry sex sorted bovine sperm]. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A pré-seleção do sexo tem grande impacto na produtividade da bovinocultura de corte e leite. A única técnica comercialmente viável para a pré-seleção do sexo, até agora, é a sexagem espermática utilizando citometria de fluxo. Atualmente palhetas de sêmen com espermatozoides sexados vêm sendo utilizadas regularmente em programas de inseminação artificial. Entretanto, ainda existem limitações referentes à taxa de gestação em condições de campo, explicadas em parte pela perda da integridade celular dos espermatozoides. O intuito deste experimento foi avaliar os efeitos da sexagem e o tempo de espera do ejaculado para a sexagem as 0, 3 e 6 hs sobre os parâmetros de motilidade pelo sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA), funcionalidade da membrana plasmática pelo teste de resistência osmótica (HOST), morfologia dos espermatozoides pela técnica de contraste de interferência diferencial (DIC) e entre as subespécies taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*). Espermatozoides sexados apresentaram a maioria dos parâmetros de motilidade superiores aos submetidos à técnica convencional, indicando que existe uma seleção por parte do citômetro de fluxo. O tempo em que o espermatozoide bovino espera (até seis horas) para ser submetido ao processo de sexagem pela técnica de citometria de fluxo alterou a linearidade (LIN). A funcionalidade da membrana plasmática foi afetada quando o espermatozoide bovino passa pelo processo de sexagem.. A sexagem induz o aumento de defeitos menores, provavelmente por alterações da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides. Os zebuínos são mais sensíveis às alterações da membrana plasmática da cauda em relação aos taurinos. Finalmente existem fortes indícios que espermatozoides bovinos que passam pela técnica de citometria de fluxo entrem em estado de hiperativação.

Palavras-chave: Sêmen sexado. Bovinos. Sistema computadorizado de avaliação da motilidade. Teste hiposmotico. Patologia espermática

ABSTRACT

MEJIA-GALLEGO.A. Assesment of Motility Chacaracteristics (CASA), morphology; plasmatic membrane functionality (HOST) in flow citometry sex sorted bovine sperm [Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozóides bovinos sexados por citometria de fluxo]. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Sex selecting has a huge impact in dairy and beef production. The only way commercially viable to obtain sex selecting nowadays, is a flow citometry sex sorted sperm technique. Currently sex sorted sperm have been used regularly in Artificial Insemination programs. Meanwhile, there are limitations about non return rate in farm conditions, superficially explained as cellular loss integrity. The objective of this experiment was assessing sex sorted sperm effects and time to wait 0, 3 and 6 hours before sorting in motility parameters by computer assisted sperm analysis (CASA), plasmatic membrane functionality by hiposmotic swelling test (HOST), sperm morphology by differential interference contrast microcopy (DIC) and between taurine subspecies (*Bos taurus taurus*) zebuine subspecies (*Bos taurus indicus*). Sex sorted sperm showed best results in the most motility parameters compared with conventional sperm, suggesting a flow citometer selection. The time to wait of the sperm (untis 6 hours) to keep sorting, altered a linearity (LIN). Plasmatic membrane functionality was affected when sperm runs through flow citometer.. Sex sorted induces increase of minor defects in sperm, probably by tail membrane plasmatic alterations. Zebuine sperm are more sensitive for tail plasmatic membrane alterations compared with taurine sperm. Finally, there is strong indication that bovine sperm that runs through flow citometer sign in hiperactivation state.

Keywords: Sexed semen. Bovine. Computer Assisted Motility Analysis. Hyposmotic swelling test. Sperm pathology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de variância para delineamento com 6 Animais, 5 tratamentos e 4 colheitas.

Pirassununga - 2010 58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Laboratório de Biotecnologia de Sêmen e andrologia. Pirassununga 2010	46
Figura 2 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais. Pirassununga 2010.	48
Figura 3 - Esquema simplificado para a obtenção da concentração espermática. Pirassununga 2010.....	50
Figura 4 - Aparelho de Citometria de Fluxo SX MOFLO®	53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) da quantidade de células (%) com funcionalidade da membrana plasmática no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga – 201059
- Gráfico 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) da quantidade de células (%) com funcionalidade da membrana plasmática no sêmen de taurinos e zebuínospós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201060
- Gráfico 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos maiores (%) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201061
- Gráfico 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos maiores (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201062
- Gráfico 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos menores (%) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201063
- Gráfico 6 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos maiores (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201064
- Gráfico 7 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos espermáticos (%) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201065
- Gráfico 8 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos espermáticos (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201066
- Gráfico 9 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade total (%) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201067
- Gráfico 10 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade total (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 201068

Gráfico 11 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade progressiva (%) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	69
Gráfico 12 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade progressiva (%) no sêmen de taurinos e zebuinos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	70
Gráfico 13 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	71
Gráfico 14 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$) no sêmen de taurino e zebuino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	72
Gráfico 15 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de progressiva ($\mu\text{m/s}$) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	73
Gráfico 16 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de progressiva ($\mu\text{m/s}$) no sêmen de taurinos e zebuinos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	74
Gráfico 17 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de curvilínea ($\mu\text{m/s}$) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	75
Gráfico 18 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de curvilínea ($\mu\text{m/s}$) no sêmen de taurinos e zebuinos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	76
Gráfico 19 - Médias ($\pm$ erros padrão) da amplitude deslocamento lateral da cabeça ($\mu\text{m/s}$) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	77
Gráfico 20 - Médias ($\pm$ erros padrão) da amplitude deslocamento lateral da cabeça ($\mu\text{m/s}$) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	78
Gráfico 21 - Médias ($\pm$ erros padrão) de frequência de batimentos no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	79
Gráfico 22 - Médias ($\pm$ erros padrão) de frequência de batimentos no sêmen de taurinos e zebuinos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010	80

Gráfico 23 - Médias ($\pm$ erros padrão) da retilinearidade no sêmen bovino pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	81
Gráfico 24 - Médias ($\pm$ erros padrão) da retilinearidade no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	82
Gráfico 25 - Médias ($\pm$ erros padrão) da linearidade no sêmen bovino pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	83
Gráfico 26 - Médias ($\pm$ erros padrão) da linearidade no sêmen bovino pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	84
Gráfico 27 - Médias ($\pm$ erros padrão) no porcentagem de células rápidas no sêmen bovino pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	85
Gráfico 28 - Médias ($\pm$ erros padrão) na porcentagem de células rápidas no sêmen de zebuínos e taurinos pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
$\mu\text{m/s}$	micrômetros por segundo
ALH	amplitude lateral da cabeça
AMPc	adenosina-monofosfato ciclica
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BCF	frequência de batimentos
CASA	sistema computadorizado da motilidade espermática
Ca^{2+}	íon cálcio
Diluidor L	diluidor Lagoa
Diluidor S	diluidor Sexing
DIC	microscopia de contraste de interferência diferencial
DMA	total de defeitos maiores
DME	total de defeitos menores
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	grama
<i>g</i>	gravidade
h	hora
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
HDL	lipoproteína de alta densidade
HO_2	hidroperóxido
HOST	teste de resistência osmótica
Hz	hertz
IA	inseminação artificial
IP	iodeto de propídio

K^{+}	íon potássio
LPC	lisofosfatidilcolina
LIN	linearidade
mg	miligrama
Mg^{2+}	íon magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MP	motilidade progressiva
MT	motilidade total
Na^{+}	íon sódio
nm	nanômetro
$O_2^{\bullet -}$	ânion superóxido
$OH^{\bullet -}$	radicais hidroxil
p	nível de significância
pH	concentração de íons de hidrogênio
PI	iodeto de propídeo
PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
RA	reação acrossômica
RNA	ácido ribonucléico
SAS	sistema de análise estatística
STR	retilinearidade
TALP	meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva
ua	unidades arbitrárias
ZP	zona pelúcida

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	percentagem
x	vezes
10 ⁶	milhões
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
+	mais/positivo
=	igual
°	grau
α	alfa
:	para (1:100)

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	LITERATURA.....	25
2.1.	PREDETERMINAÇÃO DO SEXO	25
2.2.	O ESPERMATOZOIDE	27
2.2.1.	Membrana Plasmática	28
2.2.2.	Núcleo	30
2.2.2.1.	Diferenças na quantidade de cromatina.	31
2.3.	CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN.....	31
2.4.	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	33
2.4.1.	Teste de resistência osmótica (HOST).....	34
2.4.2.	Morfologia espermática.	35
2.4.3.	Sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA).....	36
2.5.	SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES	38
2.6.	RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE ESPERMATOZÓIDES SEXADOS. .	41
3.	OBJETIVOS.....	44
4.	HIPÓTESES	45
5.	MATERIAL E METODOS	46
5.1.	LOCAL	46
5.2.	ANIMAIS E MANEJO	46
5.3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
5.4.	COLHEITA DE SÊMEN	48
5.4.1.	Avaliações do sêmen in natura.....	49
5.4.1.1.	Volume	49
5.4.1.2.	Concentração Espermática.....	49
5.4.1.3.	Motilidade, vigor e tubilhonamento.....	50
5.4.1.4.	Análise de morfologia espermática.....	51
5.5.	CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CONVENCIONAL	51
5.6.	SEXAGEM ESPERMÁTICA	52

5.6.1.	Diluição e incorporação do Hoechst 33342	52
5.7.	CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SEXADO.....	54
5.8.	AVALIAÇÕES DO SÊMEN.....	55
5.8.1.	Avaliação da funcionalidade da membrana plasmática pelo teste de resistência osmótica.	55
5.8.2.	Avaliação da morfologia espermática	56
5.8.3.	Avaliação Computadorizado da Motilidade Espermática (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis)	57
5.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.	57
6.	RESULTADOS	59
6.1.	FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO.....	59
6.2.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO.	61
6.3.	CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE PELO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (CASA) EM SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO.....	67
7.	DISCUSSÃO.....	87
8.	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXOS	117

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte e leite são atividades de grande importância dentro do agronegócio brasileiro, aportando uma porcentagem importante dentro do produto interno bruto (PIB), sendo um fator principal nas exportações e gerando empregos. Por isto procurar alternativas para aumentar a produtividade do setor, tem que ser o intuito de pesquisas para que atuem nas diferentes áreas e linhas de produção. Na bovinocultura de corte e de leite, o sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o desempenho do agronegócio (BARUSELLI 2007). Vários autores registraram o valor econômico significativo da pré- 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). A pré-seleção do sexo pode acelerar o progresso genético como também, beneficiar o manejo e a eficiência produtiva (MAXWELL et al., 2004; PARRILLA et al., 2005).

A pré-seleção do sexo é atualmente possível mediante duas tecnologias: a separação de espermatozóides X e Y ou sexagem de embriões. A sexagem de embriões é uma técnica cara e praticamente inviável comercialmente. Por outro lado, a separação espermática, baseada na diferença na quantidade do DNA (4% em Bovinos) é a única técnica validada comercialmente até hoje. A diferença entre a quantidade de DNA dos espermatozóides X ou Y é evidenciada utilizando-se uma sonda fluorescente, permitindo que estes sejam separados de acordo com a intensidade de fluorescência captada em um citômetro de fluxo (JOHNSON; WELCH, 1999).

A viabilidade da sexagem de espermatozóides em bovinos tem sido esperada por muitos anos e desenvolvimentos recentes tornaram essa tecnologia de aplicação comercial. O uso de espermatozóides sexados tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, possibilitando produção de mais de quatro milhões de palhetas de sêmen em 2008, superando os dois milhões em 2007 (SHARPE; EVANS, 2009). Entretanto, muitas limitações ainda existem, principalmente, referentes à taxa de gestação em condições de campo. (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

Os resultados de pesquisas mostraram que as taxas de gestação utilizando sêmen sexado são inferiores comparados com sêmen congelado convencional (SEIDEL et al., 1999; SHENCK et al., 2005; BODMER et al., 2005; UNDERWOOD et al., 2010). Na produção de embriões os resultados são controversos encontrando menores taxas de clivagem (MORTON et al., 2007; BERMEJO-ALVAREZ, 2008) ou não encontrando diferenças entre o sêmen sexado e o sêmen convencional congelado com embriões produzidos *in vitro* (ZHANG et al., 2003; BLONDIN et al., 2009). Estes resultados expõem a idéia de que os espermatozóides sexados são afetados por algum procedimento dentro do processo da sexagem e/ou congelação. Com esta teoria vários trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar a viabilidade dos espermatozóides sexados após descongelação (PENFOLD et al., 1998; SUH et al., 2005; BOE-HANSON et al., 2005; MOCE et al., 2006; TANNO, 2009) com resultados variados.

Sabe-se que atualmente nas centrais que tem os equipamentos para a sexagem espermática, o semen tem que esperar ate seis horas para ser colocado dentro do citometro, ainda não se conhece se este tempo poda ser prejudicial na viabilidade espermática.

Dentre as avaliações espermáticas, o sistema de avaliação computadorizado da motilidade espermática (CASA) é a resposta para obter maior objetividade da avaliação da motilidade espermática. A motilidade é um importante fator constituindo um dos parâmetros principais para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen (VARNER et al., 1991; MALMGREN, 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2000; SUAREZ; PACEY, 2006). Por outro lado, o aumento na porcentagem de alterações morfológicas (espermatozóides anormais) presentes no ejaculado, correlaciona-se diretamente com a diminuição da fertilidade (GRAHAM, 1990; VERSTEGEN et al., 2002). Finalmente o teste de resistência osmótica, permite avaliar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozóides (BAHAMONDES 2001), característica importante para todos os eventos fisiológicos para o qual o espermatozóide esta habilitado, incluindo a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozóides com o ovócito).

Neste sentido o intuito deste trabalho foi determinar a influência da sexagem espermática através da técnica de citometria de fluxo na funcionalidade da membrana plasmática, na apresentação de anormalidades morfológicas e nos parâmetros de motilidade, pelo sistema de avaliação computadorizado da motilidade espermática, CASA.

2. LITERATURA

2.1. PREDETERMINAÇÃO DO SEXO

Desde antiguidade a determinação do sexo tem sido de interesse do homem. Por exemplo na antiga Grécia o sexo masculino era o mais desejado por sua importância social e cultural, criando assim diferentes teorias empíricas. A primeira tentativa do controle do sexo foi descrito pelo filósofo *Democritus de Abadera* (460 – 370 AC) quem acreditava que os machos originavam-se no testículo direito e as fêmeas no testículo esquerdo. Posteriormente, *Aristoteles* propôs que o sexo era determinado pelo calor do indivíduo masculino e que as fêmeas seriam machos cujo desenvolvimento foi interrompido precocemente quando o frio do útero superava o calor do sêmen paterno. No ano 1677 Anton van Leeuwenhoek descreveu os espermatozoides pela primeira vez usando um microscópio melhorado. Já no final do século XIX a determinação do sexo era atribuída apenas ao cromossomo X, sendo o macho X0 e a fêmea XX. Foi somente no início do século XX que Bridges em 1914 descobriu que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X com outro morfológicamente distinto, denominando Y (PERGORATO; HOSSEPIAN DE LIMA, 2001).

A natureza tem desenvolvido vários sistemas para manter uma distribuição equilibrada da informação genética, incluindo os mecanismos relacionados com o sexo na população. Principais impactos sobre o desenvolvimento de tais sistemas estão relacionados com a dependência do ambiente de uma espécie. Por exemplo, em alguns répteis, dependendo da temperatura, as enzimas regulam o sexo da progênie (DORIZZI et al., 1996; GABRIEL et al., 2001; PIEAU et al., 2001). Entretanto, em outras espécies, o sexo é determinado dependendo da combinação dos cromossomos de sexo (ZW contra ZZ) como encontrado nos lagartos e nas tartarugas (CORIAT et al., 1994). Nos mamíferos, o regulamento preliminar da determinação do sexo depende somente da informação cromossômica, carregado pelos espermatozoides no cromossomo Y ou o X (MCLAREN; MONK, 1981). O cromossoma Y carrega na informação genética varios genes que codificam para um fator de determinação testicular (TDF) que inicia a formação do material

testicular no tecido genital primitivo. Após isso, o desenvolvimento morfológico e funcional do aparelho genital masculino é principalmente dependente de hormônios e suprime paralelamente o desenvolvimento do aparelho genital da fêmea. (MULLER et al., 1986).

Diferentes rotas tecnológicas são percorridas na tentativa de selecionar o sexo em mamíferos, tanto nas espécies de interesse zootécnico quanto em espécies ameaçadas de extinção, animais de companhia e na reprodução humana assistida. Neste sentido, existem duas alternativas: a separação de espermatozóides portadores do cromossomo X, daqueles portadores do cromossomo Y; ou a sexagem de embriões pré-implantados (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). Na separação espermática existem reportadas varias técnicas experimentais como: diferenças de densidade (ERICSSON et al., 1973), peso, diferenças em carga elétrica (KANEKO et al., 1984; ENGELMANN et al., 1988), conteúdo protéico (BLECHER et al., 1999, HENDRIKSEN et al., 1999), propriedades imunológicas (WELCH et al., 1995) ou volume cromossômico (VAN MUNSTER et al., 1999). Para a identificação do sexo dos embriões, algumas técnicas têm sido descritas, sendo as invasivas que incluem o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou análise citogenética ou as não invasivas, como a quantificação de enzimas ligadas ao cromossomo X ou testes imunológicos (GARDON et al., 2004)

Na bovinocultura de corte o impacto da pré-seleção do sexo esta representada na maior eficiência na produção de animais para abate, na produção das matrizes e o ganho genético dos animais reprodutores. Na produção de animais para abate, o peso da carcaça num macho, aos 24 meses é cerca de 25 % maior que o peso da carcaça numa fêmea da mesma idade. O valor de um rebanho com 100 % de machos vai ser 34 % maior, comparado com um rebanho composto de 40 % de machos (RUVUNA et al., 1992). Nos programas de cruzamento industrial a pré-seleção do sexo maximiza a produtividade devido às diferenças entre os sexos nas características de carcaça. (HOHENBOKEN, 1999). Na substituição das matrizes a pré-seleção do sexo é altamente eficiente porque permite manter as devidas proporções de fêmeas x machos, ou seja, garantir o número mínimo de fêmeas para manter a população de machos para abate. Segundo Taylor (1985), a manutenção desta proporção pode representar 8% de maior eficiência biológica e 22% de maior benefício econômico pelo aumento da receita bruta comparado com programas que não interferem na pré-seleção do sexo. Por outro lado, existem programas de cruzamento que são beneficiados pelo nascimento de maior proporção de fêmeas na primeira geração (F1). Essas

fêmeas são utilizadas como matrizes, ou seja, inseminadas com touros de raças terminais (com características de carcaça e conversão alimentar), o que possibilita maior rendimento na produção de carne após o abate. (HOHENBOKEN, 1999). Finalmente mediante a pré-seleção do sexo é possível produzir maior proporção de fêmeas nulíparas (as quais na média tem menor peso), evitando assim problemas de distócias comuns nelas. (BELLOWS, 1971).

Na pecuária de leite a qual têm como característica ter raças especializadas, a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino são um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). O objetivo do produtor de leite para acasalar uma vaca é obter uma lactação (consequência de uma gestação) e a produção de uma matriz seja como reposição, para aumentar o tamanho da produção ou para venda (HOHENBOKEN, 1999). Nesta ordem de idéias o nascimento de machos não é interessante em nenhum ponto de vista. Na produção de animais reprodutores, a pré-seleção do sexo permite aumentar o ganho genético mediante aumento da pressão de seleção e diminuição dos intervalos de gerações nos testes de progênie (NICHOLAS; SMITH 1983). O progresso genético será maximizado em programas de criação para a produção de leite em que a proporção sexual é controlada por ocasião da inseminação artificial, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (VAN VLECK et al., 1976).

2.2. O ESPERMATOZOIDE

O gameta masculino é produzido nos túbulos seminíferos dos testículos por um longo processo chamado espermatogênese (CHENG et al., 2004). Tal processo envolve varias divisões e transformações das células germinativas primordiais dando origem aos espermatozóides e pode ser dividido em espermatocitogênese e espermiogênese (GARNER; HAFEZ, 2004). Na espermatocitogênese, as espermatogônias, originam os espermatócitos primários $2n$, que entram em meiose sofrendo duas divisões consecutivas resultando em espermatócito secundário e espermátide, respectivamente, formando a célula haplóide (BARH; OKO, 1989). Na espermiogênese, ocorre a remodelação das espermátides, que se diferenciam de células

arredondadas em células germinativas maduras, na forma de espermatozóides (JOHNSON et al., 2000). Essa diferenciação envolve as fases de Golgi, Capuchão, Acrossoma, e Maturação. A fase de Golgi é iniciada pela formação de grânulos proacrossomáticos. Estes grânulos se fundem, formando um único compartimento que se adere ao envelope nuclear, dando início à fase de Capuchão. Esta última é caracterizada pela migração e aderência dos grânulos ao redor do núcleo da espermatide (SETCHELL, 1993) até que aproximadamente dois terços da porção anterior do mesmo sejam recobertos por um fino envoltório de dupla camada, denominado acrossoma, que se adere intimamente ao envelope nuclear (GARNER; HAFEZ, 2004). Na próxima fase, conhecida como fase de acrossoma, ocorre maiores modificações no núcleo, acrossoma e cauda das espermátides. As modificações incluem condensação da cromatina, prolongação do acrossoma e organização das mitocôndrias. A última fase, denominada maturação envolve a transformação final das espermátides alongadas em células que serão liberadas para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, em um processo chamado espermição (GARNER; HAFEZ, 2004). Nesse processo, uma grande fração do citoplasma é eliminada, quando o espermatozóide é liberado no lúmen dos túbulos seminíferos. O restante do citoplasma permanece ligado ao colo do espermatozóide formando a gota citoplasmática, que é posteriormente eliminada durante a passagem do espermatozóide pelo epidídimo (SETCHELL, 1993; GARNER; HAFEZ, 2004)

A diferenciação espermática faz que os espermatozóides sofram uma metamorfose, o que os converte em estruturas filiformes com uma cabeça pequena e um longo flagelo, que são, por sua vez, os principais componentes do espermatozóide dos mamíferos (EDDY, 1988; FAWCET, 1975; HOLSTEIN, 1981).

2.2.1. Membrana Plasmática

A membrana plasmática é organizada por uma bicamada lipídica formada por fosfolipídios e esteróis, além de proteínas integrais e periféricas incrustadas na bicamada ou associadas a ela. As regiões apolares das moléculas dos lipídeos são orientadas para o centro da bicamada, e os grupos polares, para a região extracelular ou em contato com o citoplasma, de acordo com o modelo do mosaico fluido, postulado por Singer e Nicolson (1972) (LEHNINGER et al., 2002; ANDRADE, 2009). O modelo do mosaico fluido tornou-se mais avançado e

complexo incluindo conceitos mais recentes tais como a distribuição lipídica, a assimetria da bicamada (translocases ATP-dependente), polimorfismo dos lipídios e interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (PARKS; GRAHAM, 1992; JANUSKAUSKAS et al., 2003). Os principais fosfolipídios da membrana são a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina que estão localizadas principalmente no folheto interno, e a esfingomielinina e a fosfatidilcolina no folheto externo. Por outro lado a membrana é formada por significantes níveis de ácidos graxos poliinsaturados, derivados principalmente do ácido linoléico, importantes na manutenção da fluidez e da flexibilidade da membrana (LENZI et al., 1996). A concentração de fosfolipídios poliinsaturados na membrana indica que os espermatozóides são extremamente sensíveis ao estímulo externo. Finalmente as proteínas integrais podem atuar como poros ou canais na membrana, ou como receptores de outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas possuem, aderidas a sua superfície, cadeias de carboidratos carregados negativamente, que atraem proteínas e glicoproteínas do meio externo. Esses elementos formam um verdadeiro glicocálix na superfície espermática, exercendo função primordial na interação entre essa célula e o oócito (AMANN; PICKETT, 1987; VALLE; SILVA FILHO, 2001). A função fertilizante dos espermatozóides poderia ser explicada por que a membrana espermática tem fluidez, flexibilidade e muita atividade, que pode ser facilmente desestabilizada e ativada (LENZI et al., 1996).

Dentre as principais propriedades da membrana plasmática estão permitir o transporte de moléculas seletivamente (JEYENDRAN et al., 1984) e regular o volume celular, (PETRUNKINA et al., 2005). O transporte de moléculas é feito através de canais ou poros formados pelas proteínas, existindo pouco ou nenhum transporte de moléculas hidrofílicas em regiões da membrana sem poros ou canais. Por outro lado a fluidez da membrana é devido à capacidade das moléculas de fosfolipídios de se movimentarem lateralmente. (AMANN; PICKETT, 1987).

As alterações de membrana podem variar na mudança de organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica da bicamada à total ruptura de membrana (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Mudanças na estrutura e na integridade da membrana plasmática parecem ser um importante componente associado com a redução da fertilidade dos espermatozóides pós-descongelção (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006). Mudanças na conformação da membrana, que podem ser ocasionadas pela criopreservação, resultam em

arranjos anormais dos fosfolipídios e proteínas, permitindo rápida passagem de moléculas que atravessam a membrana (AMANN; PICKETT, 1987; SANTOS, 2003). De acordo com Bailey et al. (2000), após a criopreservação, os espermatozóides sobreviventes contêm mais cálcio intracelular que anteriormente ao processo, o que reflete em danos a membrana no mecanismo de permeabilidade seletiva. Na refrigeração lenta a mudança da temperatura determina estresse sobre a membrana, sendo provável que este processo seja devido à mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana (WATSON, 1995; WATSON, 2000; GONZALEZ, 2004). As mudanças inerentes a refrigeração de qualquer célula são aumentadas pelo choque frio presumindo-se que com uma redução rápida da temperatura, a reorganização das membranas é mais difícil, com um aumento da permeabilidade, prejudicando a manutenção do metabolismo e a gradiente iônica (AMANN; PICKETT, 1987).

Em pesquisas feitas na correlação fertilidade com alterações na membrana plasmática do espermatozóide, Januskauskas et al. (2001) utilizaram H33258 para detectar espermatozóides de touros não-viáveis através da citometria de fluxo, observou uma correlação negativa entre a porcentagem de células com membrana lesada e fertilidade a campo ($r = 0.57$).

2.2.2. Núcleo

A cabeça espermática consiste, em sua maior parte, de um núcleo envolvido pelo envelope nuclear, e formado por uma massa condensada de DNA, a cromatina (JOHNSON et al., 1994). Esta é sustentada inicialmente por histonas, ricas em lisina, que são substituídas pelas protaminas, ricas em cisteína (SETCHELL, 1993), o que ocorre principalmente na fase do acrossoma e maturação durante a espermatogênese. A cromatina espermática resulta na associação entre o DNA e as protaminas. As protaminas se ligam ao DNA, possibilitando que as duplas hélices se compactem, conferindo estabilidade ao núcleo do espermatozóide para que o complexo formado seja resistente a desnaturação (UNANIAN, 2000).

2.2.2.1. Diferenças na quantidade de cromatina.

Em bovinos, cada célula somática possui 60 cromossomos. O gameta masculino, sendo célula haplóide, contém 29 cromossomos autossomos mais o cromossomo Y que determina o sexo masculino ou o cromossomo X, já que a célula diplóide é composta dos dois cromossomos (XY ou XX) (GARNER; SEIDEL JR., 2008). A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies, sendo até o momento a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozóides X ou Y *in vitro* (JOHNSON *et al.*, 1994). Em bovinos, esta diferença no conteúdo de DNA chega à cerca de 4,0 % (GARNER *et al.*, 1983; JOHNSON, 1994; GARNER, 2006). Esta diferença é evidenciada utilizando-se um corante fluorescente. Após a coloração, os espermatozóides X ou Y são separados de acordo com a intensidade de fluorescência em um citômetro de fluxo (JOHNSON; WELCH, 1999). Existe uma diferença no conteúdo de DNA das células espermáticas mesmo entre raças. Touros europeus (*Bos taurus taurus*) e os originados na Ásia (*Bos taurus indicus*) apresentam uma diferença de tamanho no cromossomo Y entre as duas espécies. O núcleo espermático de touros da raça Brahman, por exemplo, possui uma diferença menor entre o cromossomo X e o Y, por volta de 3,7%; por outro lado, a raça Jersey é a que possui a maior diferença entre eles, ao redor de 4,2% (GARNER, 2006).

2.3. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotecnologia desenvolvida para aumentar a produção e o ganho genético em sistemas de produção animal. A aceitação da tecnologia da IA forneceu suporte para desenvolvimento de outras tecnologias como criopreservação, sexagem de sêmen, transferência de embriões e clonagem (FOOTE, 2000). Em bovinos, a IA pode ser considerada uma das técnicas responsáveis pelo incremento da produtividade. No Brasil, cerca de 7% das fêmeas em idade de reprodução são inseminadas (Associação Brasileira de Inseminação

Artificial, 2008). O número crescente de rebanhos submetidos a programas de melhoramento genético e cruzamento industrial, que tem tido crescimento expressivo desde 1989, é o que permitiu que a utilização da IA apresentasse um crescimento de 350% nos últimos 10 anos.

A criopreservação de células espermáticas bovinas para o uso em inseminação artificial é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal (PESCH; HOFMAN, 2007). A criopreservação do sêmen busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozóides, que devem apresentar integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTED et al., 1990; CELEGHINI, 2005). Segundo Amann; Pickett (1987), para que o espermatozóide seja capaz de fertilizar o ovócito, ele precisa reter pelo menos quatro atributos básicos pós congelação e descongelação: Metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais, que são essenciais para a penetração do ovócito e proteínas da membrana plasmática, que são importantes para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do ovócito durante a fertilização. O processo de criopreservação é dividido em cinco partes distintas: diluição, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação. Os passos citados têm uma grande relação com a estrutura funcional das membranas espermáticas e metabolismo celular (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990). Durante o processo de congelação-descongelação ocorre o decréscimo da população espermática viável devido a danos nas membranas espermáticas, citoesqueleto e núcleo espermático (PARKS; GRAHAM, 1992), causando danos nos espermatozóides que podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais. Durante os processos de congelação e descongelação, os espermatozóides estão sujeitos a uma variedade de estresses. Dentre esses se incluem a adição de crioprotetores antes da congelação, mudanças de volume, distinção e encolhimento da membrana em consequência da exposição a condições hiperosmóticas causadas pelos crioprotetores e pela desidratação induzida pelo congelamento, a mudança de fase termotrópica e liotrópica dos fosfolípidios de membrana, e os efeitos da elevada concentração de solutos e a formação de cristais intracelulares que são dependentes da taxa de refrigeração (PARKS; GRAHAM, 1992; HOLT, 2000). As alterações celulares ocorridas durante a criopreservação e descongelação são responsáveis pela redução da

fertilidade do sêmen criopreservado, comparado com sêmen *in natura* (CELEGHINI et al., 2007). Stornelli et al, (2005) descreveram que o processo de criopreservação afeta a viabilidade das células espermáticas, pois durante a congelação e descongelação os espermatozóides são submetidos a vários ciclos de desidratação e hidratação resultando em uma troca significativa de volume e dimensão da cabeça de espermatozóides humanos (THOMPSON et al., 1994), bovinos (GRAVANCE et al., 1998) e eqüinos (ARRUDA et al., 2002). A preservação das estruturas espermáticas após a congelação é obtida por uma interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração e congelação, e descongelação, buscando minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (AMANN; PICKETT, 1987; CELEGHINI, 2005). Apesar da importância e da grande aplicação do sêmen congelado na bovinocultura com resultados satisfatórios, existe uma necessidade de aprofundamento em estudos relacionados à criopreservação, pois após o mesmo, as células espermáticas apresentam alterações de integridade e ou funcionalidade (HOLT, 2000)

2.4. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais (YANAGIMACHI et al., 1994). Os danos causados aos espermatozóides durante o processo de criopreservação podem resultar na redução de células viáveis. Iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último às membranas mitocondriais afetando o movimento progressivo dos espermatozóides e conseqüentemente a fertilidade (WATSON, 2000). Considerando a importância tanto biológica como econômica do sêmen congelado de touros, é necessário avaliar os danos irreversíveis impostos pela criopreservação (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). Nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar uma maior fertilidade potencial. Os métodos de avaliação da qualidade de sêmen congelado estão associados com a motilidade e acrossomas intactos (HERMAN et al., 1996; HAFEZ; HAFEZ,

2004). Normalmente as avaliações realizadas no sêmen criopreservado incluem volume, aspecto, motilidade, concentração, morfologia espermática (MARCHETTI et al., 2004, RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005) e teste de termoresistência (DIMITROPOULOS, 1967), porém, a avaliação da capacidade de fecundação também deve incluir testes que predizem a competência funcional dos espermatozóides (PETRUNKINA et al., 2007) contribuindo para a identificação de indivíduos sub-férteis (GADEA et al., 2004). As maiorias desses testes avaliam aspectos funcionais e estruturais como a integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e a reação acrossomal (HOLT, 2000). Assim, avaliações sofisticadas foram desenvolvidas, como a avaliação computadorizado da motilidade espermática, integridade de membranas e DNA com sondas fluorescentes (AURICH, 2005; SILVA; GADELLA, 2006; PETRUNKINA et al., 2007). Esses exames são objetivos, sensíveis e permitem repetibilidade. São usados em laboratórios modernos de andrologia como rotina, sendo considerados como promissores na avaliação individual da fertilidade em animais domésticos (CHRISTENSEN et al., 2005; PETRUNKINA et al., 2007).

2.4.1. Teste de resistência osmótica (HOST)

Durante o processo de maturação, ejaculação e fertilização, o espermatozóide passa por mudanças osmóticas (YEUNG et al., 2004). Além disso, durante o processo de criopreservação, as células sofrem desafios osmóticos adicionais (PETRUNKINA et al., 2007) podendo afetar a integridade da membrana plasmática (AURICH, 2005). Fisiologicamente quando as células são submetidas a diferenças osmóticas, tendem a restabelecer um equilíbrio (PETRUNKINA et al., 2007), na tentativa de ajustar o seu volume celular (YEUNG et al., 1999). Alguns testes são capazes de avaliar a capacidade de ajuste do volume celular (PETRUNKINA et al., 2007).

O teste de resistência osmótica tornou-se um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado (MELLO et al., 2005). Com ele avalia-se a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozóides (BAHAMONDES 2001), característica importante para todos os eventos fisiológicos para o qual o espermatozóide esta habilitado, incluindo a

fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozóides com o ovócito). Segundo Jeyendran et al. (1984), espera-se que, quanto mais espermatozóides preservarem esta característica, melhor será a qualidade do sêmen. Esta técnica caracteriza-se pelo transporte de fluidos através da membrana plasmática intacta dos espermatozóides sob condições hiposmóticas até o equilíbrio entre os compartimentos (JEYENDRAN et al., 1984).

Em solução hiposmótica, a célula espermática se expande com o influxo de fluidos, predominantemente na região das fibras da cauda. Com o “inchaço” das membranas, as fibras da cauda se dobram e enrolam, fazendo destas alterações facilmente observáveis em microscópio de contraste de fase. Os espermatozóides “inchados” são classificados como de membrana plasmática intacta (DREVIUS, 1972; JEYENDRAN et al., 1984; INAMASSU et al., 1999).

Nas células espermáticas com membrana plasmática lesada não acontece o influxo de água e aumento do volume celular, com isso não há o dobramento da cauda. Enquanto técnicas de coloração avaliam o dano físico da membrana, o teste de resistência osmótica avalia a atividade bioquímica desse compartimento celular (BRITO et al., 2003).

O teste de resistência osmótica foi considerado como um indicador de fertilidade em diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984; VAN DER VEN et al., 1986; CHAN, et al., 1991; HOSSAIN et al., 1998), eqüinos (NIE et al., 2001; MELO; HENRY, 1999; NEILD et al., 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), suínos (PÉREZ-LLANO et al., 2001) e touros (CORREA et al., 1997; ROTA et al., 2000; TARTAGLIONE; RITTA, 2004). Consiste em um método fácil, acessível e barato (CORREA; ZAVOS, 1994; TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

Revell e Mrode (1994) correlacionaram positivamente o HOST com a fertilidade em programas de IA na espécie bovina. Já Rota et al. (2000) observaram uma baixa correlação entre HOST e FIV na mesma espécie. O HOST deve ser associado com outras avaliações como a integridade estrutural da membrana plasmática, realizados pela associação de sondas fluorescentes permitindo uma avaliação rápida e precisa da viabilidade espermática (GARNER et al., 1997).

2.4.2. Morfologia espermática.

A estrutura da célula espermática pode ser avaliada por vários métodos, desde a microscopia optica com a utilização de corantes, microscopia de contraste de fase, microscopia de contraste de interferência diferencial até a utilização de sondas fluorescentes (SALVADOR et al., 2001).

A morfologia espermática é a tecnica que identifica a quantidade de espermatozóides morfologicamente normais, sendo desejáveis valores acima de 70% em um ejaculado normal. A avaliação pode ser feita com esfregaços úmidos, analisados em microscopia de contraste de fase após a fixação do material em solução salina tamponada, utilizando corantes como Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina ou utilizando o contraste de interferência diferencial, DIC. A classificação dos espermatozóides neste parâmetro pode variar de acordo com os autores (CBRA, 1998; JOHNSON et al., 2001; CARDOSO et al., 2005).

A alta frequência de espermatozóides morfologicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como cabeça, peça intermediaria ou cauda. Outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (HOWARD; PACE, 1988). A classificação das anormalidades espermáticas em defeitos maiores e menores foi proposta por Bloom (1973), classificando as patologias espermáticas em dois grupos: defeitos maiores (relacionados com a espermatogênese) e defeitos menores. Essa classificação foi realizada levando-se em consideração a maior ou menor importância da anormalidade para a fertilidade (BARTH; OKO, 1989).

2.4.3. Sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA)

Diversos sistemas de análise computadorizado de avaliação espermática (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia humana e das espécies animais (MALMGREN, 1997; TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002; AMANN; KATZ, 2004). Segundo

Amann e Katz (2004), CASA refere-se a um sistema automatizado (*Hardware e Software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozóides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global. Os espermatozóides moveis observados são posteriormente identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Finalmente as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição dessas trajetórias de forma numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma serie de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide (QUINTERO-MORENO et al., 2003; MORTIMER, 1997).

Os equipamentos utilizados no sistema CASA variam largamente entre as maquinas, ópticas e *software* usados na identificação espermática e reconstrução de sua trajetória (VERSTEGEN et al., 2002). Os sistemas CASA da empresa *Hamilton Thorne Bioscience* utilizam-se de uma iluminação estroboscópica de 662 nm para obter imagens precisas dos espermatozóides móveis. Essa iluminação atinge a amostra a ser avaliada com uma serie de *flashes* de 1 a 3 milisegundos em uma frequência de 60 Hz. Efetivamente congelando a imagen do espermatozóide durante a captura da imagem, a iluminação estroboscópica assegura imagens exatas das células em movimento, removendo erros devido a imagens desfocadas (Hamilton Thorne Biosciences, Technical Guide, 2005).

Este tipo de análise não determina somente a porcentagem da motilidade, mas também quantifica característica específicas do movimento espermático, (GARNER, 1997; MALMGREN, 1997), podendo ainda determinar a presença e a cinética das sub-populações de espermatozóides, como a avaliação da integridade das células por meio de sondas fluorescentes (MORTIMER, 1997; ABAIGAR, et al., 1999; VERSTEGEN et al., 2002; QUINTERO MORENO et al., 2003). Desta forma, Moses et al. (1994) relataram que o conjunto destes parâmetros fornece detalhes que possibilitariam melhor avaliação da qualidade do sêmen.

A validação destas informações dependerá de uma preparação cuidadosa da amostra e um ajuste adequado do equipamento (*setup*) visando identificar corretamente as células moveis, imóveis e outras partículas, geralmente estáticas, que não os espermatozóides, obtendo-se resultados seguros e comparáveis na análise (MOSES et al., 1994, HOLT; PALOMO, 1996; TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002). Para Rijsselaere et al. (2003), esta

padronização do *setup* poderia ser um dos maiores problemas do sistema CASA, sendo um requisito para que possam existir comparações de dados entre os laboratórios servindo de base para o intercâmbio tecnológico.

A terminologia empregada nos parâmetros fornecidos pelo sistema CASA foi padronizada em 1988 após dois encontros de consenso realizados pela Sociedade Americana de andrologia em Houston, Texas, e a Federação CECOS (Centre d'Etude et de Conservation du Sperme Humain), em Montpellier, na França (MORTIMER, 1997) tendo como parâmetros clássicos: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos flagelares (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Dentre os parâmetros avaliados, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, resultados de fertilização *in vitro* e penetração em ovócitos de hamster (CENTOLA, 1996).

Por outro lado, algumas imprecisões do sistema de avaliação computadorizado da motilidade espermática, CASA já foram demonstrados no momento de utilizar amostras com baixa densidade ou alta quantidade de debris (como análise de sêmen em diluentes de gema de ovo). Com o uso da ferramenta IDENT contida em alguns aparelhos é possível reduzir erros de contagem do sistema para menos de 2%. O sistema IDENT baseia-se no uso da fluorescência para fazer o contagem dos espermatozoides, identificando só os que estão emitindo uma quantidade previamente padronizada de absorbância; esta quantidade emitida é obtida pelo uso de uma sonda fluorescente específica para o DNA, desta forma só são contados as células com DNA corado.

2.5. SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES

A separação de espermatozoides bovinos em frações de espermatozoides portadores do cromossomo sexual X e portadores do cromossomo sexual Y têm sido uma técnica da reprodução assistida de interesse de cientistas durante décadas (BEAL et al., 1984). O primeiro reporte de

suceso da técnica (JOHNSON et al., 1987) utilizou a citometria de fluxo baseado na quantidade total de DNA celular (US Patent # 5135759) na pré-seleção do sexo em coelhos e se transformou na única metodologia comercial até hoje. Primeiramente, a tecnologia de sexagem de sêmen utilizava um instrumento em forma de agulha responsável por orientar as células espermáticas durante a passagem pelo citometro de fluxo. Porém com esta metodologia somente 20 a 30% dos espermatozóides poderia ser orientados (JOHNSON et al., 1999). Em 1993 Chan e colaboradores utilizaram para fertilização *in vitro*, pela primeira vez, espermatozóides X e Y de bovinos separados por citometria de fluxo. O citômetro de fluxo foi modificado para aumentar a acurácia ao medir a quantidade de DNA e diminuir a variabilidade encontrada na orientação causada pela diferença na emissão de fluorescência do perfil ou borda e da face plana do espermatozóide (RENS et al., 1998). Em 2001, a tecnologia foi adaptada para produção comercial pela XY Inc. (Sexing Technologies, Novasota, TX) para sêmen de bovinos. O desenvolvimento de um citômetro de fluxo de alta velocidade (MoFlo; Cytomation, Inc. Fort Collins, CO) com mudanças na orientação do laser, vibração acústica, orientação das células e pressão da passagem foram algumas alterações ocorridas no equipamento podendo sexar cerca de 8000 espermatozóides/s (SHARPE; EVANS, 2009).

A técnica utilizada na atualidade envolve o tratamento das células espermáticas com o corante fluorescente, Hoechst 33342 (H33342) (trihidrato de trihidrocloro, invitrogen™ Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). O Hoechst 33342 uma sonda fluorescente de membrana que se liga fortemente e de maneira específica a quatro pares de bases AATT na curvatura menor da dupla hélice do DNA (GARNER, 2009) emitindo uma fluorescência de cor azul de 351 e 364 nm de comprimento de onda no momento de passar pelo laser, sendo a fluorescência emitida proporcional a quantidade de cromatina. Em seguida, as células coradas passam pelo citômetro de fluxo através do *nozzle tip* (Cytonozzle™, parte integrante da MOFLO® SX) que orienta os espermatozóides para serem expostos ao laser UV (Vanguard™) e forma as gotas na coluna de fluido devido a vibrações estabelecidas pelo mecanismo piezoelétrico na coluna (MAXWELL et al., 2004; SUH et al., 2005). O laser UV (Vanguard™) é um sistema de estado sólido *diode-pumped* (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) que evita os efeitos lesivos de UV de baixo comprimento de onda que são absorvidos pelos ácidos nucleicos e proteínas (SEIDEL; GARNER, 2002). Os sinais fluorescentes emitidas são recebidos

simultaneamente por detectores óticos colocados a 0° e 90° em relação à face plana e extremidades da cabeça respectivamente. Os detectores convertem estes sinais em sinais eletrônicos que são armazenados em um computador como um histograma. Este laser proporciona uma medida precisa no conteúdo do DNA dos espermatozóides X ou o Y (JOHNSON; WELCH, 1999; GARNER, 2001; GARNER; SEIDEL JR., 2003; GARNER, 2006). À medida que a corrente de fluido contendo os espermatozóides saem pelo classificador, este é vibrado em alta frequência (60 a 70 KHz), causando a formação de gotas individuais (correspondendo a formação de uma gota no período de 16 a 14 μ s respectivamente para cada frequência) a uma taxa de 70.000 a 80.000/seg (SCHENK et al., 1999; PERGORATO; HOSSEPIAN DE LIMA, 2001). Cerca de um terço destas gotas contém um espermatozóide, os outros dois terços podem estar vazios e uma pequena porcentagem das gotas contém dois ou mais espermatozóides. As gotas contendo um espermatozóide X, identificado pelo computador, recebem uma carga elétrica positiva, enquanto as gotas contendo um espermatozóide Y recebem uma carga elétrica negativa. As gotas que não possuem espermatozóides, ou que apresentam mais de um espermatozóide, ou espermatozóides identificados como danificados ou que não foi possível distinguir a relativa diferença do DNA, não recebem carga elétrica (SEIDEL 2007). O feixe de gotas separadas cai em três tubos coletores, respectivamente, a uma velocidade equivalente de 50 km/h. Cada tubo contém diluidor à base de gema de ovo. Posteriormente os tubos contendo o sêmen com os espermatozóides já separados, são centrifugados e o sedimento é diluído na concentração desejada para a preservação espermática (RATH et al., 2009).

A eficiência de ligação do H33342 no DNA das células espermáticas bovinas é baixa, pois somente um terço dos espermatozóides que passam pelo sistema pode ser separado e 20% dos que são separados, são perdidos durante o processo de concentração e embase do sêmen (SEIDEL; GARNER, 2002; GARNER, 2006; GARCIA et al., 2007). A eficácia do sistema de separação dos espermatozóides foi aumentada pela identificação das células mortas ou lesadas utilizando primeiramente a sonda iodeto de propídeo (PI), cuja membrana plasmática íntegra é impermeável ao corante. Os gametas comprometidos são identificados e assim descartados junto com as células que não foram medidas apropriadamente. A substituição do PI, que se intercala entre os pares de bases do DNA, pelo FDandC #40 (Warner Jenkinson, St. Louis, EUA) proporcionou uma maior segurança porque este simplesmente bloqueia a fluorescência do

Hoechst e não é mutagênico (JOHNSON; WELCH, 1999; SCHENK et al., 1999; GARNER, 2006).

2.6. RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE ESPERMATOZÓIDES SEXADOS.

Entre os fatores que ainda limitam a eficiência da sexagem espermática pela citometria de fluxo destacam-se, principalmente, o baixo número de espermatozóides sexados viáveis; a longa exposição ao corante tóxico sob alta temperatura e a necessidade de utilizar sêmen *in natura* (JOHNSON et al., 1994). Outros fatores citados como lesivos são: o reaquecimento e incubação, forças mecânicas durante a passagem pelo citômetro de fluxo, a exposição intensa ao laser UV, a carga elétrica, a alta gravidade durante a desaceleração dentro do tubo coletor, a alta diluição, pressão elevada e resistência a mudanças na composição dos meios diluidores. Finalmente a baixa dose por palheta pode afetar a diminuição da fertilidade, porém isso diferiu entre touros (FRIJTERS et al., 2009). Estes fatores levam a diminuição na capacidade de fertilização espermática na inseminação artificial e, conseqüentemente, em menor taxa de desenvolvimento embrionário, comparado ao sêmen não-sexado (GARNER; SEIDEL JR., 2003; GARNER, 2006; MOCÉ et al., 2006; GRAAF et al., 2007; GARCIA et al., 2007)

A alta diluição para a sexagem de sêmen por citometria de fluxo é necessária para a identificação e separação da célula espermática. A esta etapa segue-se a concentração antes da inseminação artificial. Testes de viabilidade espermática com SYBR-14 e Iodeto de Propídio (IP) mostraram que o estresse mecânico da separação e a centrifugação aumentam a mortalidade ou lesões aos espermatozóides (SUH et al., 2005; GARNER, 2006; AMBROGI et al., 2006, SILVA; GADELLA, 2006). O período de coloração e incubação das células com o H33342 resultou em um decréscimo na proporção de acrossomas intactos (MORRIS et al., 2003).

A diminuição do sistema de pressão de 50 para 40 psi proporcionou uma melhora na qualidade do sêmen, tais como na motilidade, espermatozóides vivos com membrana intacta, um aumento na clivagem e desenvolvimento blastocístico sem diminuir o desempenho das máquinas (CAMPOS-CHILLON; DE LA TORRE, 2003; SUH et al., 2005). Por outro lado Suh et al.

(2006) encontraram melhoria na motilidade conforme diminui a pressão sobre os espermatozóides eqüinos.

Nas alterações celulares, sabe-se que a membrana plasmática é adversamente afetada pela citometria de fluxo e pelo processamento do sêmen, o que limita a viabilidade, a capacidade de armazenamento, a habilidade de fertilização e, além disso, pode acelerar o processo de reação acrossômica após a criopreservação (MOCÉ et al., 2006; GARCIA et al., 2007; TANNO, 2009).

Jonhson (2000) destaca que a capacitação prematura é claramente uma característica do espermatozóide sexado pelo citômetro, o que é uma desvantagem para o espermatozóide que será destinado a estocagem (congelação), mas é uma vantagem para o espermatozóide que será usado imediatamente após a separação para fazer FIV, dispensando a indução da capacitação dos espermatozóides antes da fertilização.

Boe Hansen et al. (2005) e Blondin et al. (2009), avaliando integridade de DNA, entre sêmen sexado e não sexado identificaram uma maior porcentagem de DNA integro em espermatozóides sexados, em relação ao não sexado, sugerindo que nestes trabalhos, o processo de sexagem pode ter descartado previamente espermatozóides com cromatina danificada. Em eqüinos os espermatozóides sexados tiveram menores níveis na porcentagem de motilidade e reação acrossomal comparados com espermatozóides não sexados (MARI et al., 2010). Com isso, é razoável que o sêmen sexado apresente uma fertilidade inferior *in vivo* comparado ao sêmen convencional (MOCÉ; GRAHAM; SCHENK, 2006).

Embora a separação das células resulte na eliminação de espermatozóides mortos ou lesados, aquelas células que sobrevivem ao processo de sexagem tendem a se deteriorar mais rapidamente do que o controle, em touros e em bodes, mas, aparentemente, isso não ocorre em sêmen de garanhões e de carneiros (MORRIS et al., 2003; GARNER, 2006). Em eqüinos os espermatozóides não resistem períodos longos depois do sexagem (Lindsay 2002). Nos efeitos da criopreservação do sêmen sexado, Blondin et al. (2009) encontrou em análise por meio da citometria de fluxo, que o sêmen sexado e não-sexado a fresco possuíam, significativamente, porcentagens menores de reação acrossômica, lesão de membrana e de atividade mitocondrial, quando comparados com o sêmen congelado e descongelado sexado e não-sexado. Parrilla et al. (2005) observaram em sêmen de cachacos que o processo através da citometria de fluxo é capaz de manter a motilidade, viabilidade e integridade acrossomal em ótimos níveis durante 10 horas

de armazenamento após a separação dos espermatozóides, porém a capacidade fertilizante foi mantida somente durante 5 horas após a sexagem.

Com o aumento da eficiência dos protocolos de fecundação *in vitro* poucos espermatozóides são necessários para fecundar um oócito. Assim, a probabilidade de emprego de espermatozóides sexados é maior. Em bovinos, utilizando-se 5 a 10 mil espermatozóides sexados/oócito é possível, por citometria de fluxo, separar-se por hora espermatozóides X suficientes para se fecundar até 2200 oócitos. De acordo com Lu et al. (1999); Zhang et al. (2003) e Oliveira et al. (2005) o potencial de fertilização de sêmen sexado por citometria de fluxo tem sido demonstrado em fecundação *in vitro* (FIV). Ao utilizar ejaculado de três diferentes touros em experimentos com FIV, foi observado que a sexagem por citometria de fluxo e a coloração do DNA não afeta o desenvolvimento até blastocisto (ZHANG et al., 2003). Entretanto, utilizando espermatozóides sexados, sem submetê-los a congelação, obtém-se índice de apenas 66% de clivagem e 16 a 20% de desenvolvimento (LU et al., 1999; GUTHRIE et al., 2002).

As taxas de gestação do sêmen sexado criopreservado estão entre 70% - 90% em relação ao sêmen sexado convencional, porém os resultados são afetados pelo número de espermatozóides por dose inseminante e diferentes estratégias de inseminação (SEIDEL et al., 1999). Entretanto, outros estudos têm mostrado que as taxas de fecundação ou prenhes de 10 a 30% menores que as do grupo controle com utilização de sêmen não sexado (LU et al., 1999; BODMER et al., 2005; SHENK et al., 2005). Finalmente, Weigel et al. 2004 trabalhando com novilhas a campo encontraram taxas de prenhes em torno de 35-40% e 55-60% utilizando sêmen sexado e convencional respectivamente, sendo estas baixas taxas o fator limitante para a utilização do sêmen sexado nos Estados Unidos (WEIGEL, 2004).

Estes estudos demonstraram grande variação de resultados na utilização do sêmen sexado, não sendo ainda muito bem entendidas as causas, sobre tudo as taxas de fertilidade menores comparadas com amostras de sêmen convencional.

3. OBJETIVOS

Levando-se em consideração a necessidade de informações mais precisas sobre os efeitos da sexagem espermática em bovinos utilizando a técnica de citometria de fluxo, os objetivos desta pesquisa foram:

1. Avaliar os efeitos da sexagem sobre os parâmetros de motilidade pelo sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA), funcionalidade da membrana plasmática pelo teste de resistência osmótica (HOST), morfologia dos espermatozóides pela técnica de contraste de interferência diferencial (DIC) e entre as subespécies taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*).
2. Avaliar se o tempo de espera do ejaculado (0, 3 e 6 hs) para a sexagem provoca alterações nos parâmetros de motilidade, na funcionalidade da membrana plasmática, morfologia dos espermatozóides e entre as subespécies taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*).

4. HIPÓTESES

1. Os espermatozóides bovinos submetidos à técnica da sexagem por citometria de fluxo apresentam maior porcentagem de células com anormalidades morfológicas, menor função da membrana plasmática e menores parâmetros de motilidade do que os espermatozóides submetidos à técnica convencional, sendo que existem diferenças entre subespécies taurina (*Bos taurus taurus*) e zebuína (*Bos taurus indicus*).
2. O tempo de espera do ejaculado para a sexagem pela técnica de citometria de fluxo provoca alterações morfológicas, diminuição da motilidade e diminuição da função da membrana plasmática nos espermatozóides bovinos, sendo existem diferenças entre subespécies taurina (*Bos taurus taurus*) e zebuína (*Bos taurus indicus*).

5. MATERIAL E METODOS

5.1. LOCAL

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, sendo que a primeira consistiu na sexagem e congelação do sêmen no laboratório da Sexing Technologies do Brasil, localizada na Central CRV Lagoa, na cidade de Sertãozinho, SP; e a segunda referente às análises laboratoriais, realizada no Laboratório de Biotecnologia de Sêmen e Andrologia (Figura 1), do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga, SP.

Figura 1 – Laboratório de Biotecnologia de Sêmen e Andrologia. Pirassununga 2010

5.2. ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados seis touros em idade reprodutiva, sendo três taurinos da raça Holandesa Preta e Branca (*Bos taurus taurus*) e três zebuínos da raça Gir Leiteira (*Bos taurus indicus*), mantidos sob as mesmas condições ambientais, em piquetes individuais com água e sal mineral *ad libitum* e alimentação nutricional balanceada. Os animais foram pesados quinzenalmente e realizado controles de endo e ectoparasitos regularmente.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Baseado nos objetivos deste trabalho foi delineado um experimento, no qual foram congeladas 12 palhetas de sêmen de cada touro de um total de 6 touros (3 taurinos e 3 zebuínos) 4 ejaculados por touro e 5 tratamentos ($12 \times 6 \times 4 \times 5 = 1440$ Palhetas). Cada ejaculado foi dividido em cinco alíquotas (5 tratamentos) para produzir **sêmen convencional (não sexado)** utilizando-se dois diluidores diferentes denominados de **diluidor (L) Lagoa (T1)** e outro com diluidor utilizado para a sexagem do sêmen pela técnica de citometria de fluxo, **diluidor (S) Sexing (T2)**. Ainda, produzir **sêmen sexado**, subdivididos em três tratamentos (**T3, T4 e T5**) de acordo com o tempo de espera do sêmen antes da técnica de sexagem espermática. Os tratamentos T3, T4 e T5 significavam sêmen *in natura*, submetidos à técnica de citometria de fluxo apos tempos zero, três e seis horas respectivamente. Em todos os cinco tratamentos a concentração na palheta (0,25 mL) foi de 2,1 milhões de espermatozóides. Para as avaliações espermáticas foram utilizadas: Avaliação da funcionalidade da membrana plasmática pelo teste de resistência osmótica, avaliação das características morfológicas por contraste de interferência diferencial (DIC) e avaliação dos parâmetros de motilidade pelo sistema de avaliação computadorizado da motilidade espermática (CASA – Computer Assisted Sêmen Analysis). Um esquema resumido do delineamento experimental encontra-se na figura 2.

Figura 2 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais. Pirassununga 2010

5.4. COLHEITA DE SÊMEN

As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial, com auxílio de uma vaca manequim devidamente contida. Foram utilizadas seis touros sendo três taurinos da raça Holandesa Preta e Branca (*Bos taurus taurus*) e três zebuínos da raça Gir Leiteira (*Bos taurus*

indicus). Foram realizadas quatro colheitas de sêmen de cada animal com intervalos semanais (6 touros x 4 ejaculados, n = 24).

Apos a colheita, o ejaculado foi encaminhado rapidamente ao laboratório para análise.

5.4.1. Avaliações do sêmen *in natura*

O ejaculado foi analisado quanto ao volume, concentração espermática, motilidade vigor e alterações morfológicas. Todo material utilizado na colheita de sêmen e avaliação do sêmen foi mantido aquecido, na temperatura à 37° C para evitar o choque térmico e alterações das características seminais.

5.4.1.1. Volume

O volume foi determinado pela leitura direta do tubo de 15 mL graduado com fração de 0,1 mL.

5.4.1.2. Concentração Espermática

A concentração espermática foi determinada por um contador nuclear denominado NucleoCounter® SP-100™ System com software versão 1.21 (CM part no. 900-0100) – Chemometec A/s DK – 3450 Allerød, Dinamarca), calibrado para o programa DF 401, para o qual dilui-se 25 µL de sêmen em 10 mL de reagente S100 (CM part no. 910-0100), responsável pela lise da membrana celular, em um tubo de 15 mL.

Em seguida, foi homogeneizado em um vortex durante 12 segundos, aproximadamente e uma alíquota foi separada para leitura em um SP1 – Cassette™ (CM part no. 941-0006) – Chemometec. O SP1 – Cassette™ contendo iodeto de propídio (PI), que identifica as células lesadas pelo reagente S100 e realiza a contagem nuclear celular.

Figura 3 - Esquema simplificado para a obtenção da concentração espermática

5.4.1.3. Motilidade, vigor e tubilhonamento.

Uma alíquota de 10 µL de sêmen *in natura* foi diluída em 500 µL de diluidor à base de Tris e gama de ovo pré-aquecido (37°C) para avaliação da motilidade. A motilidade foi avaliada em uma gota de 10 µL da alíquota diluída colocada entre lâmina e lamínula e visualizada em aumento de 1000 x sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

O vigor, referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento foi classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais veloz movimento progressivo e uniforme. Foi observado em uma gota de 10 μ L da alíquota diluída entre lâmina e lamínula em aumento de 1000x, em DIC.

Para avaliação do turbilhonamento, uma amostra de 10 μ L de sêmen fresco foi depositada em lâmina pré-aquecida a 37°C e a análise foi efetivada sem lamínula, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) em aumento de 1000x. O movimento de massa das células foi classificado em escala que variou de 0 (movimento ausente) a 5 (máximo).

5.4.1.4. Análise de morfologia espermática.

Para a avaliação das alterações morfológicas, foram adicionadas 10 μ L de formol salino tamponado no tubo pré-diluído para a avaliação previa da motilidade. Em seguida, foi realizada a leitura da morfologia em preparação úmida com aumento de 1000 x sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (OLYMPUS AX70, Olympus True Research System Microscoper model AX70, Melville, NY), contando 100 células por amostra. As porcentagens das diversas alterações morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores (BLOOM, 1973). Somente ejaculados com concentração igual ou superior 1000 x 10⁹ espermatozóides por mililitros, 60% de motilidade progressiva, vigor maior do que o escore 3 e menos de 20% de defeitos totais foram utilizados no experimento.

5.5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CONVENCIONAL

Após as avaliações de sêmen *in natura*, duas alíquotas do ejaculado foram retiradas para o preparo do **sêmen convencional (não sexado)** utilizando-se dois tipos de diluidores denominados **diluidor (L) Lagoa (à base de TRIS-gema de ovo) (T1)** e outro com o mesmo

diluidor utilizado para a sexagem de sêmen pela técnica de citometria de fluxo, **diluidor (S) Sexing (à base de TRIS-gema de ovo centrifugado®) (T2)**.

Logo após a diluição, os tubos contendo sêmen convencional, previamente identificados, permaneceram em banho Maria a 34°C por uma hora e 30 minutos. Em seguida, foram encaminhados para a câmara-fria a 5°C por aproximadamente 4 horas, protegidos da luz para aguardar o envase e congelação.

Foram emvasadas 12 palhetas por tratamento, as quais foram cuidadosamente identificadas com o nome do touro, subespécie, partida do ejaculado e tratamento. A quantidade de espermatozóides por palheta (0,25 mL) foi de 2,1 milhões.

As palhetas foram congeladas em caixa de isopor contendo 7 cm de altura de nitrogênio líquido a uma distância de 4 cm das palhetas durante 20 minutos, sob vapor do nitrogênio líquido. Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Imediatamente após, as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos para posterior análise.

5.6. SEXAGEM ESPERMÁTICA

Apos avaliações do sêmen *in natura*, três alíquotas do ejaculado foram preparadas para produzir o **sêmen sexado**, sendo que cada alíquota foi retirada nos tempos zero, três e seis horas, respectivamente (T3, T4 e T5) de acordo com o tempo de espera do sêmen.

5.6.1. Diluição e incorporação do Hoechst 33342

Para a sexagem dos espermatozóides uma solução estoque de Hoechst 33342 foi preparada a 8.89 mM (5 mg/mL) com água ultrapura, corante cuja função foi penetrar na membrana celular e ligar-se a regiões específicas do DNA, que são os 4 pares de bases ricos em adenina-timina das menores depressões da hélice de DNA (GARNER, 2009). O sêmen foi

diluído nos tempos zero, três e seis horas, na concentração de $200 \times 10^6/\text{mL}$, em TALP modificado (meio Tyrode com albumina, lactato e piruvato) em pH de 7,4 visando alcançar maior eficiência do corante Hoechst 33342. Após a amostra foi incubada a 34°C durante 45 minutos protegida dos efeitos da luz.

Em seguida, foi adicionado TALP contendo 4% de gema de ovo clarificada e 0,002% de “food colouring dye” (FDandC#40 Power, Waner Jenkinson Company Inc., St Louis, MO, USA), que teve como objetivo diminuir o pH, prevenindo dano celular e, também, apagar o H33342 dos espermatozóides com as membranas celulares comprometidas (SCHENK et al., 1999; GARNER, 2001; GARNER, 2009), permitindo o descarte destas células no momento de separação no citômetro de fluxo.

Cada amostra foi filtrada à unidade gravitacional em um filtro de nylon com poros de $50 \mu\text{m}$ (CellTricsTM, Partec GmbH, Germany) para a remoção de debris ou espermatozóides aglutinados, formando uma solução final de 4 mL com uma concentração de 80×10^6 espermatozóides/mL e mantidas em temperatura à 21°C durante a separação espermática no citômetro de fluxo.

Figura 4 - Aparelho de Citometria de Fluxo SX MOFLO[®]

O citômetro de fluxo usado no experimento (Figura 4) foi o SX MOFLO[®] operando a 40 psi. A fluorescência que foi emitida pelas células quando excitadas pelo laser VanguardTM, sistema de estado sólido de *diode-pumped* (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) passou por dois detectores de fluorescência (PMT), localizados a 0° e a 90°, um com a função de orientar corretamente as células e, outro para medir o valor da fluorescência. Dependendo da onda emitida, foi dada uma carga elétrica na célula, ou seja, o espermatozóide contendo o cromossomo X recebeu uma carga negativa, sendo atraído pelo campo positivo e o oposto para os espermatozóides contendo o cromossomo Y.

Um diluidor (*Sheath Fluid*) a base de TRIS (hidroximetil aminometano – TRIS 197,0 Mm) ácido cítrico monohidratado (55,4 mM) e frutose (47,5 mM) foi utilizado para formar o fluxo hidrodinâmico onde as células espermáticas percorreram.

As células separadas pelo citômetro de fluxo (SX MOFLO[®]) foram coletadas em tubos cônicos graduados para centrifuga de 50 mL, contendo diluidor sem glicerol, denominado de *catch* (meio TRIS – 2% gema de ovo – Sexing Technologies, Navasota, USA) que foi diluído como 16% de água, até atingir o volume de 20mL. A concentração final de um tubo foi de aproximadamente $8,0 \times 10^5$ espermatozóides / mL, como consequência da mistura dos diluidores durante a separação. Em seguida foram colocados sob refrigeração a 5°C por um período de 90 minutos.

5.7. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SEXADO

Após a refrigeração, foi adicionado ao sêmen, diluidor TRIS contendo 12% de glicerol em duas etapas, com intervalo de 15 minutos (9,5 mL cada). O sêmen foi levado à centrifuga refrigerada à 5°C, SORVALL[®] RC-4 (Heareus Sorvall, Asheville, NC), a $850 \times g$ durante 20 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento formado e o sedimento formado foi homogeneizado e colocado em um único tubo, com uma concentração aproximada de 40×10^6

espermatozoides/mL. Em seguida foi retirada uma alíquota de 25 μ L para a determinação da concentração a través do NucleoCounter[®] SP-100[™] system AN-103 (ChemoMetec A/S Gydevang 43, DK-3450 Allerød, Dinamarca), visando a adição do restante do diluidor TRIS-gema até atingir concentração final de $9,4 \times 10^6$ de espermatozoides/mL (considera-se em torno de um milhão de espermatozoides perdidos durante o envase)

Logo após a diluição com TRIS-gema de ovo, o sêmen permaneceu protegido da luz à temperatura de 5°C durante 3 horas (tempo de equilíbrio) para então, ser emvasado em palhetas de 0,25 mL (IMV[®], Aigle, France). As palhetas foram congeladas em caixa de isopor contendo 7 cm de altura de nitrogênio a uma distância de 4 cm das palhetas durante 20 minutos, sob vapor do nitrogênio líquido. Em seguida, as palhetas foram retiradas e imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Imediatamente as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos para posterior análise.

5.8. AVALIAÇÕES DO SÊMEN

Para a avaliação do sêmen três palhetas do mesmo animal, partida e tratamento foram descongelados a 37°C por 30 segundos.

5.8.1. Avaliação da funcionalidade da membrana plasmática pelo teste de resistência osmótica.

Para a avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, foi utilizado o teste de resistência osmótica segundo o descrito por Revell; Modre (2004). Foi feita uma solução hiposmótica a base de citrato de sódio (9,0 g) e frutose (4,9 g) diluídos em 1000 mL de água destilada e deionizada, tendo uma osmolaridade final de 150 mOsm kg^{-1} . Foram colocados 40 μ L de sêmen em 960 μ L da solução hiposmótica e incubados durante 60 minutos. Posteriormente, 7 μ L da solução final foram colocadas em uma lâmina de 25 x 76 mm e coberta por uma lamínula de 22 x 22 mm previamente limpas e aquecidas. Foram contadas 100 células em microscopia de

contraste de fases com aumento de 400x, sendo classificadas células com enrolamento da cauda e células com cauda reta. Para obter os resultados foram retirados os valores das anormalidades morfológicas da cauda. O resultado final foi expresso em porcentagem de células com enrolamento da cauda, ou seja, com membrana plasmática com função.

5.8.2. Avaliação da morfologia espermática

Para as avaliações das características morfológicas dos espermatozóides o sêmen foi diluído e fixado com 3 μ L de formol salino tamponado a 5%, previamente aquecido (37° C). Foi preparada uma câmara úmida, com 10 μ L de sêmen diluído entre lâmina e lamínula e a avaliação realizada pela contagem de 100 células em aumento de 1.000x sob microscopia de contraste de interferência diferencial, DIC (Nikon, modelo 80i).

Os defeitos maiores dos espermatozóides foram representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal e contorno anormal de cabeça), defeitos de peça intermediária (fibrilação, fratura total, fratura parcial, edema e pseudogotas), defeitos de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada com gota citoplasmática distal anexa), além de defeitos de acrossomo, “*pouch formation*” e gota citoplasmática proximal. A somatória da ocorrência desses defeitos contados em uma amostra do ejaculado resulta em um índice denominado “total de defeitos maiores”.

Os defeitos menores dos espermatozóides foram representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal), defeitos de implantação (abaxial, retroaxial, oblíqua), defeitos de cauda (cauda dobrada, cauda enrolada) e gota citoplasmática distal. A somatória da ocorrência desses defeitos contados em uma amostra do sêmen resulta em um índice denominado “total de defeitos menores”.

O total de defeitos espermáticos foi dado pela somatória de defeitos maiores e do total de defeitos menores.

Finalmente do total de anomalias espermáticas obtidas por amostra de sêmen, foram divididas em defeitos de acrossomo, defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária e defeitos de cauda. Esta última com o intuito de subtrair nos valores de cauda enrolada do teste de resistência osmótica.

5.8.3. Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis)

Para a avaliação das amostras do sêmen não sexado (sêmen convencional com diluidor Lagoa e sêmen convencional com diluidor Sexing) os espermatozoides foram corados com 5 µL de uma solução estoque de Hoechst 33342 preparada a 8.89 mM (5 mg/mL) com água ultra pura e incubadas a 34°C por 45 minutos protegidas dos efeitos da luz. Nos ejaculados sexados (sêmen sexado 0, 3 e 6 horas após) os espermatozoides já tinham incorporado o Hoechst 33342.

Uma amostra de 10 µL de sêmen foi colocada em câmara de leitura (Makler® counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel), a qual foi inserida no aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA) que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para um programa computacional responsável por realizar a análise, sendo previamente ajustado no *set up* (Anexo A), para a análise de sêmen bovino na opção IDENT. No mínimo quatro campos foram selecionados para a leitura e análise. As variáveis analisadas foram, motilidade total, motilidade progressiva, velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos flagelares (BCF), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN), de acordo com Arruda (2000)

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados das médias e seus respectivos erros padrão foram apresentados em forma de gráficos. Os dados foram analisados empregando-se o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). Para as análises estatísticas, os valores em porcentagem foram transformados em arco-seno. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância (Tabela 1). O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

Tabela 1 - Análise de variância para delineamento com 6 Animais, 5 tratamentos e 4 colheitas. Pirassununga - 2010

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Tratamento	4
Touro	5
Resíduo	110
Total	119

6. RESULTADOS

Nesta seção encontram-se descritos os resultados obtidos no presente experimento.

6.1. FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) da quantidade de células (%) com funcionalidade da membrana plasmática no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Após a descongelamento das amostras foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos de sêmen sexado em diferentes tempos (T3, T4 e T5) e os tratamentos de sêmen convencional com diferentes diluidores (T1 e T2), mostrando que o sêmen sexado tem menor

funcionalidade da membrana plasmática. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) mesmo sendo congelados com diferentes diluidores. Da mesma forma, a funcionalidade da membrana não se mostrou afetada ao longo do tempo nos tratamentos do sêmen sexado (T3, T4 e T5).

Não houve diferença estatística ($P>0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) da quantidade de células (%) com funcionalidade da membrana plasmática no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na comparação entre as subespécies taurina e zebuína para a funcionalidade da membrana plasmática não foi encontrada diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos de tratamentos (convencional e sexado) e entre os tratamentos convencionais e sexados.

6.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DO SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) do total de defeitos maiores (%) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) no total de defeitos maiores entre os tratamentos do sêmen convencional (T1 e T2) e do sêmen sexado (T3, T4 e T5). Dentro dos grupos de tratamentos (sêmen convencional e sêmen sexado) também não foi encontrado diferença estatística ($P > 0,05$), demonstrando que o total de defeitos maiores não foi afetado pelos diferentes diluidores nos tratamentos com sêmen convencional (T1 e T2) como pelo tempo de espera para a sexagem nos tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos maiores (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para o total de defeitos maiores não foi encontrado diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na comparação entre as subespécies taurina e zebuína entre os tratamentos convencional e sexado. Foi encontrada uma diferença numérica na apresentação do tratamento convencional com diluidor Sexing (T2) e os tratamentos sexados após 0, 3 e 6 horas (T3, T4 e T5), onde os espermatozoides taurinos apresentaram maior número de anormalidades morfológicas de tipo maior, mas sem diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) do total de defeitos menores (%) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Foi encontrada diferença estatística ($P < 0,05$) para o total de defeitos menores entre os grupos de tratamentos (sêmen convencional e sêmen sexado), sugerindo que o processo de sexagem pode causar alterações na apresentação de anormalidades morfológicas menores. Não foi encontrada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) e entre os tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5). Isto demonstra que a apresentação dos defeitos menores não foram influenciados pelos diluidores nem pelos tempos de sexagem.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 6 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos maiores (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) na apresentação de defeitos maiores entre a subespécie taurina e zebuína nos grupos de tratamentos sexados. Os zebuínos tiveram maior apresentação de anomalias de tipo menor nos tratamentos sexados com 0, 3 e 6 horas após (T3, T4 e T5), observando-se um aumento com respeito ao tempo de sexagem (efeito do tempo). Nos tratamentos convencionais com diferentes diluidores (T1 e T2), além de não se observar diferença estatística significativa ($P > 0,05$), se manteve a mesma tendência numérica que os tratamentos sexados.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 7 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos espermáticos (%) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para o total de defeitos espermáticos foi encontrado diferença estatística ($P < 0,05$) entre o sêmen convencional com diluidor Sexing (T2) e o sêmen sexado após 6 horas. Não foi encontrada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamentos (sêmen convencional e sêmen sexado). Entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) não houve diferença estatística ($P > 0,05$) demonstrando assim não ter efeito do diluidor na apresentação de anormalidades morfológicas.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 8 - Médias ($\pm$ erros padrão) no total de defeitos espermáticos (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Com respeito ao número total de defeitos espermáticos, foi encontrada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) no tratamento sexado após 0 hora (T3), tendo a espécie zebuína maior número de anormalidades morfológicas espermáticas. Nos tratamentos convencionais os resultados são controversos, apresentando maior número de anomalias espermáticas no tratamento convencional com diluidor Lagoa nos zebuínos (T1) e no tratamento convencional com diluidor Sexing (T2) nos taurinos, mesmo assim não tendo diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

6.3. CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE PELO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (CASA) EM SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 9 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade total (%) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos com o sêmen convencional (T1 e T2) e sêmen sexado (T3, T4 e T5) para a motilidade total (%) demonstrando que o sêmen sexado tem melhores parâmetros de motilidade total que o sêmen convencional. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre tratamentos com o sêmen convencional com diferentes diluidores (T1 e T2) e o sêmen sexado a diferentes tempos (T3, T4 e T5).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 10 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade total (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para a motilidade total entre a subespécie taurina e zebuína, não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$), para cada um dos tratamentos. Nos tratamentos de sêmen convencional, com diluidor Lagoa (T1) e Sexing (T2) não foi encontrada diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 11 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade progressiva (%) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Em relação a motilidade progressiva houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) e os tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) demonstrando que o sêmen sexado tem melhores parâmetros de motilidade progressiva, como demonstrado para a motilidade total. Nos tratamentos com sêmen convencional (T1 e T2) e sêmen sexado (T3, T4 e T5) não houve diferença estatística ($P > 0,05$) demonstrando assim não ter efeito de diluidor e de tempo de espera para a sexagem sob as características de motilidade progressiva.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 12 - Médias ($\pm$ erros padrão) na motilidade progressiva (%) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para os resultados da motilidade progressiva, foi encontrado diferença significativa ($P < 0,05$) entre a espécie zebuína e taurina para o tratamento sexado após 6 horas, sendo que os zebuínos apresentaram melhores resultados. Nos tratamentos de 0 e 3 horas após (T3 e T4) embora de não ter diferença significativa, foi observada uma diferença numérica, sendo iguais os resultados ao tratamento de sêmen sexado após 6 horas e podendo sugerir o efeito do tempo sobre os resultados. Nos tratamentos convencionais não foi encontrada diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 13 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de trajeto (VAP) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na velocidade de trajeto (VAP) houve diferença estatística entre os tratamentos com sêmen convencional (T1 e T2) e tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5), sugerindo que os espermatozoides sexados tiveram mais velocidade de trajeto do que os espermatozoides convencionais. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) dentro dos tratamentos de sêmen convencional (não demonstrando efeito de diluidor sobre a velocidade de trajeto) e os tratamentos de sêmen sexado (não demonstrando efeito de tempo de sexagem sobre o efeito de sexagem).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 14 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de trajeto (VAP) no sêmen de taurino e zebuino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Em relação as velocidades de trajeto (VAP), não foi encontrado diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as espécies taurina e zebuína, para cada um dos tratamentos.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 15 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de progressiva (VSL) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

As médias de velocidade progressiva (VSL) para os tratamentos de sêmen convencional foi de 55,64 $\mu\text{m/s}$ e para os tratamentos de sêmen sexado foi de 80,63 $\mu\text{m/s}$ tendo diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os dois grupos de tratamentos. A diferença entre as médias dos tratamentos de sêmen convencional com diferentes diluidores (T1 e T2) foi de 2,75 não havendo diferença estatística entre eles ($P > 0,05$). Da mesma forma a diferença entre as médias dos tratamentos de sêmen sexado a diferentes tempos (T3, T4 e T5) ficou entre 3,95 $\mu\text{m/s}$ não tendo diferença estatística entre eles ($P > 0,05$).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 16 - Médias ($\pm$ erros padrão) na velocidade de progressiva (VSL) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Não foi observado diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para os resultados da velocidade progressiva (VSL) avaliada pelo sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA) entre as espécies taurinas e zebuínas.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 17 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de curvilnear (VCL) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na velocidade curvilnear houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos de tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) e tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5), demonstrando que o sêmen sexado foi melhor. Para os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) eliminando o efeito de diluidor na velocidade curvilnear. Da mesma forma para os tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 18 - Médias ($\pm$ erros padrão) da velocidade de curvilinear (VCL) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na comparação entre as espécies taurina e zebuína, não foi encontrada diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para o parâmetro de velocidade curvilinear (VCL).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 19 - Média ($\pm$ erros padrão) da amplitude deslocamento lateral da cabeça (ALH) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) houve diferença ($P < 0,05$) entre os grupos de tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) e os tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5). Entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) não houve diferença estatística, mas entre os tratamentos do sêmen sexado houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre o sêmen sexado 3 horas após (T4) e o sêmen sexado após 6 horas (T5), sugerindo que tem efeito do tempo de sexagem sob o ALH.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas apos e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas apos e posterior criopreservação

Gráfico 20 - Média ($\pm$ erros padrão) da amplitude deslocamento lateral da cabeça (ALH) no sêmen bovino pós-descongelação submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), foi encontrada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre a espécie taurina e zebuína no tratamento sexado apos 0 horas após, (T3), sendo a subespécie zebuína com piores resultados.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 21 - Médias ($\pm$ erros padrão) de Frequência de Batimentos (BCF) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Houve diferença estatística ($P < 0,05$) na frequência de batimentos (BCF) entre o tratamento de sêmen convencional com diluidor Lagoa (T1) e todos os outros tratamentos (T2, T3, T4 e T5), sugerindo que o diluidor Sexing aumentou a frequência de batimentos. No tratamento com sêmen convencional com o diluidor Sexing (T2) e sêmen sexado as 0 horas (T3), houve diferença estatística ($P < 0,05$). Entre os tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 22 - Médias ($\pm$ erros padrão) de Frequência de Batimentos (BCF) no sêmen de taurinos e zebuínos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na frequência de batimentos (BCF) entre a espécie zebuína e taurina para nenhum dos tratamentos.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas apos e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas apos e posterior criopreservação

Gráfico 23 - Médias ($\pm$ erros padrão) da retilinearidade (STR) no sêmen bovino pós-descongelção submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Na retilinearidade das células das amostras avaliadas não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamentos de sêmen convencional e sêmen sexado, entre os tratamentos de sêmen convencional nem entre os tratamentos de sêmen sexado.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 24 - Médias ($\pm$ erros padrão) da retinilearidade (STR) no sêmen de taurinos e zebuinos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na retinilearidade (STR) entre as espécies zebuína e taurina nos tratamentos.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 25 - Médias ($\pm$ erros padrão) da linearidade (LIN) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para a linearidade (LIN) das células dos tratamentos estudados houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4) com o sêmen sexado após 6 horas (T5). Entre os tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$), eliminando o efeito de diluidor sob a linearidade das células.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 26 - Médias ($\pm$ erros padrão) da Linearidade (LIN) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Nos resultados da linearidade entre as subespécies taurina e zebuína, foi encontrada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) no tratamento convencional com diluidor Sexing (T2) e no tratamento sexado após 0 horas (T3), com melhores resultados para a subespécie taurina. Nos tratamentos sexados após 3 e 6 horas, não foram encontrados diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 27 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de células rápidas (RAP) no sêmen bovino pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos de sêmen convencional e sêmen sexado para a porcentagem de células rápidas, mostrando que a sexagem aumentou a quantidade de células com movimento rápido. Entre os tratamentos com sêmen convencional e com sêmen sexado não houve diferença estatística ($P > 0,05$), eliminando o efeito de diluidor e o efeito do tempo sobre o parâmetro avaliado.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

T1 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor L (Lagoa)

T2 - Sêmen criopreservado pela técnica convencional com diluidor S (Sexing)

T3 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo no tempo zero e posterior criopreservação

T4 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo três horas após e posterior criopreservação

T5 - Sêmen diluído, submetido à técnica de citometria de fluxo seis horas após e posterior criopreservação

Gráfico 28 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de células rápidas (RAP) no sêmen de zebuínos e taurinos pós-descongelamento submetido ao tratamento convencional (diluidores L e S) e sexado (tempos 0, 3 e 6 h) – Pirassununga - 2010

Para a porcentagem de células rápidas (%), foi encontrada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre a subespécie taurina e zebuína para o tratamento sexado após 6 horas (T5) tendo melhor resultado os zebuínos. Nos tratamentos convencionais não se teve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as subespécies.

7. DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado que o processo do sexagem de sêmen pela técnica de citometria de fluxo envolve várias etapas que podem promover alterações na funcionalidade da membrana, nas características da motilidade e na morfologia espermática dos espermatozóides. Estas etapas são: o uso do corante de DNA (Hoechst 33342), reaquecimento e incubação, forças mecânicas de vibração para a formação da gota durante a passagem da célula espermática pelo *nozzle tip*, a exposição ao laser UV, a carga elétrica, a alta gravidade durante a desaceleração do espermatozóide dentro do tubo coletor, a alta diluição, pressão elevada (40 psi) e resistência a mudanças na composição dos meios diluidores, a centrifugação, a refrigeração e o processo de criopreservação (GARNER; SEIDEL JR., 2003; GARNER, 2006; MOCÉ et al., 2006; GRAAF et al., 2007; GARCIA et al., 2007). Desta forma muitos estudos relatam uma menor fertilidade do sêmen sexado em relação ao sêmen congelado convencional (SEIDEL et al., 1999, LU et al., 1999, SARTORI 2004, SEIDEL; SCHENK 2008). No entanto, existe a necessidade de mais estudos em relação ao assunto. O presente estudo teve o intuito de avaliar algumas características da viabilidade do sêmen bovino sexado pela técnica de citometria de fluxo.

7.1. Funcionalidade da Membrana Plasmática.

A funcionalidade da membrana plasmática é definida como a capacidade de permitir o transporte de moléculas seletivamente, sendo diferente da integridade da membrana a qual avalia estrutura. (JEYENDRAN et al., 1984). No gráfico 1 pode-se observar melhor resultado (maior % de espermatozóides com enrolamento da cauda) na funcionalidade da membrana entre os grupos de tratamentos de sêmen convencional com respeito aos grupos de tratamentos de sêmen sexado tendo diferença estatística significativa ($P < 0,05$). Este resultado concorda com o obtido por Carvalho (2009) que utilizou diacetato de 6 carboxifluoresceína (CFD-A) e Iodeto de propídio (IP) avaliando integridade da membrana plasmática em microscopia de epifluorescência. Por outro, lado diverge do encontrado por Tanno (2009) e Blondin (2009) avaliando a integridade da

membrana plasmática com o uso de Iodeto de Propídio em citometria de fluxo, onde encontraram melhores resultados nos tratamentos com sêmen sexado comparado com sêmen congelado convencional, mesmo não encontrando diferença estatística. Esta alteração pode ser devida ao estresse mecânico sofrido pelo espermatozóide (GARNER 2006) visto que já foi demonstrado que uma diminuição da pressão com que o citômetro de fluxo (MOFLO[®]) trabalha, durante o processo da sexagem, aumentou a sobrevivência de espermatozóides e conseqüentemente a taxa de fecundação (SUH et al., 2005) e de gestação (SHENCK et al., 2009). No entanto, apesar da menor pressão minimizar os danos no espermatozóide, ela pode comprometer a acurácia da sexagem, sendo que em algumas espécies torna a célula incapaz de se orientar corretamente no aparelho (GARNER 2006). Com respeito ao tempo que o espermatozóide espera antes da sexagem, 0 hora (T3), 3 horas (T4) e 6 horas (T5) notou-se que, conforme foi passando o tempo, a porcentagem de células com funcionalidade da membrana plasmática foi diminuindo, mas tendo uma diferença numérica pequena, sem diferença estatística ($P > 0,05$). Por ser o teste de resistência osmótica um teste que depende da habilidade do técnico, não se pode afirmar que se tem um efeito do tempo após a sexagem para a funcionalidade da membrana plasmática. Tanno (2009) avaliando integridade da membrana plasmática (com iodeto de propídio pela citometria de fluxo encontrou o mesmo resultado (efeito do tempo sob a sexagem) mesmo não tendo diferença estatística.

Quanto se comparou as espécies taurina e zebuína (gráfico 2) observou-se uma diferença numérica, com melhor resultado para a espécie zebuína na funcionalidade da membrana no grupo de tratamentos sexados (T3, T4 e T5), mesmo não tendo diferença estatística. Tanno (2009) encontrou diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre subespécies, para a quantidade de espermatozóides com integridade de membrana plasmática sem reação acrossômica, população espermática com peroxidação lipídica e membrana plasmática íntegra quanto lesada por citometria de fluxo, tendo melhores resultados na subespécie zebuína sugerindo que esta tem maior resistência para suportar os danos da integridade na membrana. Por outro lado Lucio et al. (2009) e Oliveira (2009), não observaram diferença nos percentuais de lesão de membrana plasmática e acrossomal, nem função mitocondrial de sêmen sexado e convencional entre taurinos e zebuínos.

Quando o sêmen permaneceu aguardando para iniciar o processo de sexagem (tempo de espera 0 hora, 3 horas e 6 horas), notou-se que os espermatozóides zebuínos foram diminuindo a porcentagem de células com funcionalidade da membrana para os tempos T3 (47,25), T4 (47,08) e T5 (43,75), mesmo não tendo diferença estatística significativa. Este resultado discorda com o encontrado por Tanno (2009) além de obter melhor resultado no tempo 0 após a sexagem, obtive melhor resultado 6 horas após a sexagem com respeito ao tratamento após 3 horas, avaliando integridade da membrana plasmática pela citometria de fluxo. Com isto pode-se sugerir que não houve diferença nos tempos de espera para a sexagem para a espécie zebuína. Na espécie taurina não foi encontrado efeito de tempo na funcionalidade da membrana, porque a porcentagem de células foi melhor no tempo 6 horas após (T5) que o tempo 3 horas após (T4).

7.2. Anormalidades Morfológicas.

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 et al., 2007).

No total de defeitos maiores no gráfico 3 pode-se observar que se tiveram maiores resultados no tratamento de sêmen convencional com diluidor Lagoa (T1: 6,75) e no tratamento de sêmen sexado 6 horas após (T5: 6,79), mas não se apresentaram diferenças estatísticas significativas entre nenhum tratamento. Isso pode sugerir que a sexagem, não tem influência sobre as anormalidades morfológicas do tipo maior nem entre os tipos de tratamentos (convencional e sexado), mesmo entre os tempos após a sexagem (0, 3 e 6 horas). Na comparação entre as subespécies, além de não se encontrar diferenças estatísticas, se tem resultados numéricos onde se apresentou maior quantidade de anormalidades morfológicas na subespécie taurina respeito na zebuína, nos tratamentos que utilizaram o diluidor Sexing seja sêmen

convencional (T2), e sêmen sexado (T3, T4 e T5). Mesmo assim não se pode afirmar que a espécie taurina seja mais susceptível na apresentação de defeitos maiores.

Ficou nítido em nosso experimento que houve aumento significativo na quantidade de defeitos menores ao longo do tempo de espera (0, 3 e 6 horas) dos espermatozóides que passaram pelo processo de sexagem por citometria de fluxo. O tipo de defeito menor que mais se apresentou foi cauda enrolada. Estes achados nos leva a pensar que tanto o tempo de espera, bem como o processo de sexagem, utilizando o citômetro de fluxo, induz alterações na funcionalidade da membrana plasmática da cauda dos espermatozóides. Por outro lado, em relação às subespécies taurina e zebuína, ao contrário do observado na avaliação da apresentação de defeitos maiores, a espécie zebuína teve uma maior quantidade de defeitos menores em todos os tratamentos do tempo de espera (0, 3 e 6 horas), mostrando que os espermatozóides da espécie zebuína são mais susceptíveis a apresentarem defeitos menores quando submetidos processo da sexagem.

Em relação ao total de anormalidades morfológicas (gráfico 7), foi notado pequena diferença de anormalidades no sêmen sexado comparado com o sêmen convencional, este resultado aproxima-se ao encontrado por Kline (2007) que avaliou sêmen convencional e sexado, argumentando que com o uso do rotineiro do corante *food dye* é possível eliminar espermatozóides anormais, principalmente aqueles com defeitos localizados na cabeça.

Contudo, vale ressaltar que no presente estudo, mesmo com a elevação nas porcentagens de defeitos menores e totais, estes se mantiveram dentro do limite preconizado para sêmen congelado de touros (CBRA, 1998).

7.3. Sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática.

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). Na busca de maior objetividade

nessa avaliação, vários métodos têm sido propostos, entre eles o sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA). Esse tipo de análise permite uma avaliação mais exata e objetiva da motilidade, fornece informações precisas (MORTIMER, 1997; COX et al., 2006) e determina não somente a percentagem de células móveis na amostra, mas também quantifica características específicas do movimento espermático (GARNER, 1997).

No estudo realizado pelo sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática (CASA), os parâmetros motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) foram melhores para os grupos de tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) quando comparado aos grupos de sêmen convencional (T1, T2) encontrando diferença estatística significativa, como se pode observar nos gráficos 9, 11, 13, 15 e 17. Este resultado concorda com uma das hipóteses do experimento reafirmando que existe uma seleção feita pelo sistema de citometria de fluxo reduzindo a população de células mortas e com lesão celular através do descarte de espermatozoides comprometidos identificados pelo corante *food colour* (FDandC 40). Por outro lado, estes resultados discordam com os encontrados por HOLLINSHEAD et al., (2004), BLONDIN et al., (2009) e CARVALHO et al., (2009a) o qual encontraram parâmetros de motilidade (MOT, MP) e de velocidade (VAP, VCL e VSL) avaliados pelo sistema CASA, melhores nos tratamentos de sêmen convencional comparados com tratamentos de sêmen sexado. Uma explicação aos resultados pode ser a concentração padronizada utilizada neste trabalho ($2,1 \times 10^6$ spz / palheta) que foi igual em todos os tratamentos. Uma grande influência da concentração espermática nos resultados fornecidos pelo sistema CASA foi relatada por Verstegen et al., (2002), onde citaram que, em alta concentração, as células com movimento rápido poderiam ser excluídas da análise em razão das colisões entre elas. Outra explicação para os resultados discordantes seria que em nossa pesquisa utilizamos a ferramenta IDENT a qual identifica a fluorescência emitida por espermatozoides corados no DNA, melhorando a acurácia na contagem.

Nos resultados das velocidades (VAP, VSL e VCL) CELEGHINI (2005) obteve resultados discordantes no CASA entre os diluidores testados, onde o diluidor que apresentou melhor preservação da motilidade total e progressiva, 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. Neste trabalho foram utilizados 2 diluidores: diluidor Lagoa com sêmen convencional a base de TRIS gema de ovo (T1), diluidor Sexing à base de TRIS-gema de ovo centrifugado® com sêmen convencional (T2) e diluidor sexing com sêmen sexado (T3, T4 e T5). 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). O uso de diluidores com diferentes componentes pode influenciar positivamente ou negativamente na avaliação espermática pós-descongelamento (ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2007).

Em relação ao parâmetro amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH), observou-se no presente trabalho que os grupos de tratamentos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) tiveram valores mais altas comparado com o grupo de tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) como pode observar-se no gráfico 19. 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 um valor de ALH mais baixo. No entanto, neste experimento não foram encontrados diferenças entre os tratamentos convencional com diluidor lagoa (T1) e sexing (T2), provando não existir efeito de diluidor.

AUGER et al., (1989) relataram grande amplitude de variação no ALH, sendo um parâmetro citado na literatura humana como indicador do movimento de hiperativação característico da capacitação espermática. 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 movimento espermático vigoroso, não progressivo e não linear 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 sofre 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 curvilínea (VCL). O aumento da velocidade curvilínea (VCL) e da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), assim como a diminuição da linearidade (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). Neste experimento houve um aumento significativo no valor obtido quando se comparou os grupos de sêmen sexado (T3, T4 e T5) com os grupos de sêmen convencional (T1 e T2) para os parâmetros de VCL e ALH, assim como uma diminuição na linearidade (LIN) para o tratamento sexado após 6 horas (T5) e diferenças numéricas entre os outros tratamentos, como se pode ver nos gráficos 17, 19 e 25. Levando-se em consideração os apontamentos citados acima, existem fortes indicações sugerindo que os espermatozoides que passaram pela técnica de citometria de fluxo estão em estado de hiperativação.

Em relação ao parâmetro de frequência de batimento flagelar (BCF), segundo MORTIMER (1997), quando esse aumenta, acompanhado de diminuição do deslocamento lateral da cabeça (ALH), relaciona-se com a capacidade do espermatozóide penetrar o muco cervical. Neste trabalho para o BCF observou-se efeito de diluidor encontrando melhor resultado para o diluidor sexing (T2, T3, T4 e T5) comparado com o diluidor lagoa (T1) com diferença estatística significativa como pode se observar no gráfico 21. 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). Com isto pode-se sugerir que o diluidor sexing é mais eficiente na proteção das mitocôndrias comparado com o diluidor lagoa.

Para a linearidade (LIN) foram encontrados piores resultados nos tratamentos de sêmen sexado com diferença estatística significativa no tratamento sexado após 6 horas (T5) com respeito aos tratamentos de sêmen convencional (Gráfico 25). Na retilinearidade (STR) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre nenhum tratamento (Gráfico 23) e finalmente na porcentagem de células rápidas (RAP) houve melhores resultados entre os grupos de tratamentos de sêmen sexado comparado ao sêmen convencional com diferença estatística

significativa (Gráfico 27). Acredita-se que maiores valores de STR, LIN e RAP 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.

Na comparação entre as subespécies taurina e zebuína para os grupos de tratamentos sexados (T3, T4 e T5) comparados com os grupos de tratamentos de sêmen convencional (T1 e T2) foram encontradas diferenças estatísticas significativa na motilidade progressiva (MP) no tratamento sexado após 6 horas (T5), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) no tratamento sexado após 0 hora (T1) e na porcentagem de células rápidas (RAP) no tratamento sexado após 6 horas (T5), com maiores resultados para a subespécie zebuína. Por outro lado foi encontrada diferença estatística significativa no parâmetro de Linearidade (LIN) nos tratamentos de sêmen convencional com diluidor sexing (T2) e sêmen sexado após 0 horas (T3) com resultados maiores para a subespécie taurina.

Estes resultados não podem ser conclusivos devido ao tamanho da população testada (3 animais por subespécie) que 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 (efeito do animal).

Com os resultados nos tempos de espera para a sexagem, nos resultados encontrados neste experimento pode-se comprovar que o ejaculado mantido à temperatura ambiente (21°C) por até seis horas para a produção do sêmen sexado vendido comercialmente aparentemente não altera a taxa de prenhez, visto que não há reclamações de partidas específicas, ou seja, de acordo com o tempo de espera do ejaculado para o início do processo de sexagem, resultado que concordou com o encontrado por Tanno (2009).

Com isto pode-se sugerir que os espermatozóides sexados por citometria de fluxo têm a capacidade de chegar até o ponto de fertilização (usualmente oviduto) demonstrado nos parâmetros da motilidade, mas tem diminuída a capacidade fecundante por causa das alterações na funcionalidade da membrana plasmática assim como a indução da reação acrossomal e capacitação (MOCE et al., 2006, BLONDIN et al., 2009, TANNO 2009)

Finalmente Blondin et al., (2009) e Moce et al., (2006) demonstraram que foi o processo de congelamento e não o processo da sexagem o que gerou os danos na membrana plasmática, sugerindo que o processo de sexagem deixaria os espermatozóides mais sensíveis a futuras injúrias.

8. CONCLUSÕES

A funcionalidade da membrana plasmática é afetada quando o espermatozóide bovino passa pelo processo de sexagem pela técnica de citometria de fluxo, no entanto, esta diferença não existe entre a subespécie taurina (*Bos Taurus*) e zebuína (*Bos Indicus*).

A funcionalidade da membrana plasmática não é afetada pelo tempo em que o espermatozóide bovino espera (até seis horas) para ser submetido ao processo de sexagem pela técnica de citometria de fluxo.

A sexagem utilizando a técnica citometria de fluxo induz o aumento de defeitos menores, provavelmente por alterações da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides.

Os zebuínos são mais sensíveis às alterações da membrana plasmática da cauda em relação aos taurinos.

Espermatozoides sexados pela técnica de citometria de fluxo apresentam a maioria dos parâmetros de motilidade superiores aos submetidos à técnica convencional.

O tempo em que o espermatozóide bovino espera (até seis horas) para ser submetido ao processo de sexagem pela técnica de citometria de fluxo altera a linearidade (LIN).

O diluidor *sexing* preserva melhor a frequência de batimentos (BCF) em relação ao diluidor *lagoa*.

Existem fortes indícios que espermatozoides bovinos que passam pela técnica de citometria de fluxo entrem em estado de hiperativação.

REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T; HOLT, W. V.; HARRISON, R. A. P.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus Scrofa*) and Gazelle (*gazella dama mhorrr*) sêmen as revealed by pattern analysis of computer- assisted motility assessments. **Biology of Reproduction**, v. 60, n.1, p. 32-41, 1999.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n.4, p. 659-668, 1995.
- AMANN, R. P. Issues affecting commercialization of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1441-1457, 1999.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n 3, p. 317-325, 2004.
- AMBROGI, M; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66,n.8, p. 1994-2000, 2006.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J. L.; ANTON, M. Bull sêmen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, n.5, p. 895–907, 2004.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSHINEN, E.; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and sêmen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61,n.7, p. 1583-1588, 2004.
- ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos. 2009.** 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** 2000. 121 f. 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.; GARCIA, A. R.; LIU, I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, stohenam, v. 58, n.2, p. 253-256, 2002.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R., NASCIMENTO, J.; RAPHAEL.C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, **Anais**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004 p. 166-179
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006 p. 157-164
- ARRUDA, R. P.; FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F. Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 329, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, (ASBIA). Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen **2008**. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2008.pdf> Acesso em : 30 julho 2010
- 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, n.6. 439-448, 1989.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v 89, p 65-75. 2005
- BAHAMONDES, L.; FAZANO, F.; LUCIO, M. A.; NEVES, P. A.; BOTTCHEIR LUIZ F.; LORENZETTI, G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. **andrologia** v 33, p 75-77. 2001
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER N. Sêmen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**. V. 21, p.1-7, 2000
- BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. Circular Técnica EMBRAPA Pecuária Sudeste, n.41, p.1-13, 2005.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ed. Ams Iowa: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

- BARUSELLI, P. ,S; SOUZA H; MARTINS, C.L; GIMENES, L. U ; SOUSA J.N ; SALES, J.N ; AYRES, H ; ANDRADE A.F.C ; RAPHAEL, C.F ; ARRUDA F.C. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v.31, p.374-381, 2007.
- BEAL, W. E.; WHITE, L. M.; GARNER, D.L. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1432 – 1436, 1984.
- BELLOWS, R. A.; SHORT R. E.; ANDERSONS, D. C.; KNAPP, B. W.; PAHNISH O. F. Cause and effect relationships associated with calving difficulty and calf birth weight. **Journal of Animal Science**. v. 33, p. 407 – 415, 1971.
- BERMEJO-ALVAREZ, P; RIZOS, D; RATH,D; LONERGAN,P AND GUTIERREZ-ADAN, A. Can bovine in vitro-matured oocytes Selectively Process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reproduction** v.79, p. 594–597, 2008
- BLECHER, S.R.; HOWIE R, LI, S.; DETMAR. J, BLAHUT L.M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology** v. 52, p.1309 – 1321, 1999
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W. A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BOE-HANSEN GB, MORRIS ID, ERSBOLL AK, GREVE T, CHRISTENSEN P.DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63 p.1789–802. 2005
- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DASS, 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.
- BREIBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, p. 263-268, 2005.
- BREIBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 151-159, 1999.
- BRENER, E .; RUBINSTEIN, S .; COHEN, G.; SHTERNALL, K; RIVLIN, J.; BREIBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 837-845, 2003.

- BRITO, L.F.C.; BARTHA, A.D.; BILODEAU-GOESELSB, 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.
- BROWERS, J. F.; SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458-469, 2005.
- BUFFONE, M. G.; CALAMERA, J. C.; VERSTRAETEN, S. V.; DONCEL, G. F. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. **Reproduction Research**, v. 129, p. 697-705, 2005.
- BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, p. 580-589, 2007.
- CAMPOS-CHILLON, L. F.; DE LA TORRE, J. F. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of in vitro produced embryos. **Theriogenology**, v. 59, p. 506, 2003.
- CARVALHO, J.O; SARTORI, J; LEMES, A.P; MOURÃO, G.B; NUNES, D. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.10, p.1346-1351, 2009.
- CATT, S. L.; O'BRIEN, J. K.; MAXWEKK, W. M. C.; EVANS, G. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p. 251-258, 1997.
- CATT, S. L.; SAKKAS, D.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P. G.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 821-825, 1997.
- CBRA Colegio Brasileiro de Reprodução Animal. 2 ed Belo Horizonte: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 186 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 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.; and RADE, 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.
- CERCHIARO, I.; CASSANDRO, M.; DAL ZOTTO, R.; CARNIER, P.; GALLO, L. A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 2538-2542, 2007.
- CHAN, P.; TREDWAY, D.; SU, B.; CORSELLE, J.; REN, R. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. **Human Reproduction** v 6, p 1115-1118, 1991.
- CHENG, F. P; WU J. T; CHAN J. P; WANG J. S; FUNG H. P; COLENBRANDER B ; TUNG K.C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved sêmen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v.61, p.1605-1616, 2004.
- CORIAT, A. M.; VALLELEY, E.; FERGUSON, M. W.; SHARPE P. T. Chromosomal and temperature-dependent sex determination: the search for a conserved mechanism. **J Exp. Zool.** v. 270, p. 112-116. 1994
- CORREA J.R.; ZAVOS P.M. The hyposmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of frozen-thawed bovine sperm membrane **Theriogenology** v.42, p.351-360,1994
- CORREA J.R.; PACE M.M.; ZAVOS P.M. Relationships between frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine sêmen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology** v 48, p.721– 731. 1997
- COX, J.F; ALFARO, V; MONTENEGRO, V AND RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology** v.66, p. 860-867, 2006
- DASGUPTA, S.; MILLS, C. S.; FRASER, L. R. Ca^{2+} related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by chlortetracycline fluorescence assay. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 135-143, 1993.
- DE VRIES, A.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed sêmen on the structure of the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 91, p. 847-856, 2008.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicine Veterinary**, v.4, p.215- 224, 1967.

DREVIUS, L.O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, p.41- 54, 1972.

DORIZZI, M., N. RICHARD-MERCIER.; PIEAU. C The ovary retains male potential after the thermo sensitive period for sex determination in the turtle *emys orbicularis*. **Differentiation**, v 60, p 193-201, 1996

DRUMMEN, G. P. C.; VAN LIEBERGER, L. C. M.; OP DEN KAMP, J. A. F.; POST, J. A. C-11 BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 473-490, 2002.

EDDY EM (1988) The spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil E, Neill J, Ewing L, Greenwald G, Markert C, Pfaff D, eds) Raven Press Ltd, New York, 27-68

ENGELMANN, U.; KRASSNIGG, F.; SCHATZ, H.; SCHILL, W.B.: Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. **Gamete**, v 19, p 151-160, 1988.

ERICSSON, R.J.; LANGEVIN, C.N.; NISHINO, M. Isolation of fractions rich in Y spermatozoa **Nature** v 246, p 421-424, 1973

FAWCETT, D.W.; The mammalian spermatozoon. **Develomental Biology** v. 44, n.2, p. 394-436, 1975

FLESCHE, F. M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; GADELLA, B. M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 787-792, 1999.

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

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, p. 1-10, 2000.

FRASER, L.; DZIEKÓNSDA, A.; STRZERŻEK, R.; STRZERŻEK, J. Dialysis of boar sêmen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. **Theriogenology**, v. 67, p. 994-1003, 2007.

FRIJTERS, A. C. J.; MULLAART, E.; ROELOFS, R. M. G.; VAN HOORNE, R. P.; MORENO, J. F.; MORENO, O.; MERTON, J. S. What affects fertility of sexed bull sêmen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**, v. 71, p. 64 -67, 2009.

FULWYLER, M. J. Hydrodynamic orientation of cells. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 25, p. 781-783, 1977.

GABRIEL, W. N., B. BLUMBERG, S. SUTTON, A. R. PLACE and V. A. LANCE: Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. **Journal of Experimental Zoology**, v 290, p.439-448, 2001.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARCIA, M. A.; GRAHAM, J. K. Effects of low-molecular proteins (LMWF) from milk, egg yolk and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 429-436, 1987a

GARCIA, M. A.; GRAHAM, J. K. Dialysis of bovine sêmen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-454, 1987b.

GARCIA, E. M.; VÁSQUEZ, J. M.; PARRILLA, I.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; ROCA, J.; VASQUEZ, J. L.; MARTÍNEZ, E. A. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 771-778, 2007.

GARDON J.C., AGUERA S, CASTEJON F. Sexing in vitro produced bovine embryos at different stages of development using rat H-Y antiserum **Theriogenology** v 62, p 35–43, 2004

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A.; 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. Ancillary tests of bull sêmen quality. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.**, v. 13, p. 313- 321, 1997.

GARNER, D. L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology**, v. 22. p. 519-526, 2001.

GARNER, D.L.; SEIDEL, JR, G. E. Past, Present and future perspectives on sexing sperm. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 375-384, 2003.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole 2004, cap. 7, p. 97-110.

GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.

GARNER, D. L.; SEIDEL, JR., G. E. History of commercializing sexed sêmen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 886-895, 2008.

GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enabled the differentiation of living X- an Y- chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 11-21, 2009.

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

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY, P. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 704 – 709, 1998

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow Cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozóide e a integridade de membrana do espermatozóide bovino**. 2004. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004

GRAAF, S. P.; BEILBY, K. H.; UNDERWOOD, S. L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. **Theriogenology**, v. 71, p. 89-97, 2009.

GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M. C.; O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 217-227, 2007.

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

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion sêmen and its relation to fertility. **Veterinary Clinincs of North America.: Equine Practice**, v. 12, p. 119-130, 1996.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.

- 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.
- Hamilton Thorne Biosciences, Technical Guide. (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA) 2005
- HARRISON, R. A. P.; GADELLA, B. M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, p. 342-351, 2005.
- HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reproduccion e inseminacion artificial en animales. Septima edicion. Editorial. Maz Graw Hill. 2002.
- HENDRIKSEN P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology** v 52, Issue 8, 1295-1307, 1999
- HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa? **Theriogenology**, v. 71, p. 1138-1146, 2009.
- HOHENBOKEN, W. D. Aplication of sexed sêmen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, p. 1421-1433, 1999.
- HOLLINSHEAD, F. K.; O'BRIEN, J. K.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome bearing spermatozoa. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 14, p. 503-508, 2002.
- HOLLINSHEAD, F.K.; O'BRIEN, J.K.; MAXWELL, WMC.; EVANS, G. Assesment of in vitro sperm characteristics after flow citometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 958-968, 2004.
- HOLSTEIN AF, ROOSEN-RUNGE EC . **Atlas of human spermatogenesis**. Grosse Verlag Berlin, 224 p. 1981
- HOLT, W. V.; PALOMO, M. J. Optimization of a continuous real- time computerized sêmen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of sêmen preparation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 219-230, 1996
- HOLT, W. V.; Basic aspects of fronzen storage of sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

- HOSSAIN, A.M.; RIZK, B.; BARIK, S. Time course of hypoosmotic swellings of human spermatozoa: evidence or ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**, v.13, p.1578-1583, 1998.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, (supl), p. 219-228, 2007.
- HOWES, E.; PASCALL, J. C.; ENGEL, W.; JONES, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucid during fertilization. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 4127-4136, 2001.
- HOWARD, T.W.; PACE, M.M. Seminal evaluations and artifitial examination. In: **Fertility and infertility in Veterinary Practise**. 4. Ed. London: Bailliere Tindall,. P. 39-51. 1988
- HUNTER, R. H. F. Sex determinatin, differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge University Press. 1995
- INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.302-304, 1999.
- JANUSKAUSKAS,A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L., Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull sêmen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999
- JANUSKAUSKAS A, GIL J, SODERQUIST L, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction Domestic Animals** 35, 207–212. 2000
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed sêmen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-61, 2001.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull sêmen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.
- JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD L.I.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sêmen characteristics. **Journal Reproduction Fertility** v. 70, p. 219-225, 1984

JOHNSON L.A, FLOOK J.R and LOOK M.V Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342 **Gamete Research** v.17, p. 203–212, 1987

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y bearing sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 199-203, 1989.

JOHNSON L.A, WELCH G.R and GARNER D.L Improved flow sorting resolution of X- and Y-chromosome bearing viable sperm separation using dual staining and dead cell sorting **Cytometry** 17 Supplement 7, 28. 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, p. 1323-1341, 1999.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the- art. **Animal Reproduction**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

JONES, R.; JAMES, P. S.; HOWES, L.; BRUCKBAUER, J.; KLENERMAN, D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p. 438-444, 2007.

JONES, R.; SHALGI, R.; HOYLAND, J.; PHILLIPS, D. M. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. **Developmental Biology**, v. 139, p. 349-362, 1990.

KANEKO S, OSHIRO S, KOBAYASHI T, ITZUKA R and MOHRI H Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 124, p. 950–955, 1984

KLINC, K. FRESE, D. OSMERS, H. RATH, D. Insemination with Sex Sorted Fresh Bovine Spermatozoa Processed in the Presence of Antioxidative Substances **Reproduction in Domestic Animals** Volume 42, Issue 1, pages 58–62, February 2007

KUMI-DIAKA J. Subjecting canine sêmen to the hypoosmotic test. **Theriogenology** v.39, p.1279-1289, 1993

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosoma reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 175-194, 1997b.

- LAMIRANDE, E.; O'FLAHERT, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 106-115, 2008.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Membranas biológicas e transporte. In: Lehninger, A.L. **Princípios da bioquímica**. São Paulo: Sarvier. cap. 12, p. 301-339. 2002
- LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-256, 1996.
- LEWIS, B.; AITKEN, R. J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 611-622, 2001.
- LINDSEY, A. C.; MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R.; SHENK, J. L.; SQUIRES, E. L.; BRUEMMER, J. E. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 128-132, 2002.
- 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 and blastocyst development on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-citometrically sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.
- LUCIO, A. C.; OLIVEIRA, L. Z.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Influence of bovine subspecies in the recovered rate after the separation of X- bearing sperm by centrifugation in discontinuous Percoll density gradient. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 336, 2009. Supplement.
- MALMGREEN, L. Assessing the quality of raw sêmen. a review. **Theriogenology** v 48, p 523 – 530, 1997
- MARI, G; RIZZATO G; MERLO B; IACONO E; BUCCI D; SEREN E; TAMANINI C; GALEATI G; SPINACI M. Quality and fertilizing ability in vivo of sex-sorted stallion spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, v.45, p. 331-335, 2010
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p.660–665, 2007.
- MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; FORMSTECHE, 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.

- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 408-418, 1997.
- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- 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, 1996.
- MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-95, 2004.
- MCLAREN, A.; MONK, M. X-chromosome activity in the germ cells of sex-reversed mouse embryos. **Journal Reproduction Fertility**. v.63, p. 533-537, 1981
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.
- MOORE, L. H. A.; TATCHER, W. W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1254-1266, 2006.
- MORRIS, L. H. A.; HOLLINSHEAD, F. K.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. The longevity and acrosome status of stallion flow-sorted spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 512, 2003.
- 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.
- MOSES, D. F.; DE LAS HERAS, M. A.; VALCÁRCEL, A.; PÉREZ, L., BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **andrologia**, v. 27, p. 25-29, 1994.

MULLER, T. DONLON, M. SCHMID, N. FITCH, C. L. RICHER, M. LALANDÉ and S. A. LATT (1986): Deletion mapping of the testis determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY and 46,X,dic(Y) females. **Nucleic Acids Res.** v.14, p. 6489-6505, 1986

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1828-1835, 2003.

NEILD D, CHAVES G, FLORES M, MORA N, BECONI M, AGUERRO A Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology** v. 51, p.721-727, (1999)

NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v.55, p.1005-1018, 2001.

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'CONNEL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n 3, p. 704-709, 2002.

OLIVEIRA, K.M; GALASSI, A.; DINIZ, E.G.; FRANCO, R.V.R. First results IVF with sexing sperm in Brazil. In Sociedade Brasileira de transferência de embriões. Angra dos Reis. **Acta científica Veterinária**. Porto Alegre: Scientific Publication Support program, v.33, p. 347-347, 2005.

OLIVEIRA, L. Z. **Efeitos do processo de seleção do sexo por centrifugação em gradiente de densidade na qualidade de espermatozoides bovinos**. 2009. 135 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; LUCIO, A. C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Sperm damage evaluation caused by separation of X-bearing sperm by centrifugation in discontinuous Percoll density gradient using fluorescence probes association. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 335, 2009. Supplement.

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

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p. 209-222, 1992.

- PARRILLA, I.; VASQUEZ, J. M.; CUELLO, C.; GILL, M. A.; ROCA, J.; DI BERARDINO, D.; MARTÍNEZ, E. A. Hoechst 33342 Stain and UV exposure do not induce genotoxic effect in flow-sorted boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 128, p. 615-621, 2004.
- PARRILLA, I.; VASQUEZ, J. M.; GIL, M. A.; CABALLERO, I.; ALMIÑANA, C.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 86-98, 2005.
- PENFOLD, L. M.; HOLT, C.; HOLT, W. V.; WELCH, G. R.; CRAN, D. G.; JOHNSON, L. A. Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 323-327, 1998.
- PÉREZ-LLANO, B.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; YENES, P.; GARCÍA-CASADO, P. Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. In: **Proceeding of 6th International Conference on Pig Reproduction**. Columbia, USA 50 p. 2001.
- PERGORATO, L.M.C; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Seleccin del sexo en mamíferos. In PALMA, G.A. Biotecnología de la reproducción. 1 edicion. INTA. Balcarce, P 317-351, 2001
- PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproduktionsmedizin Endokrinologie**, V2, p. 101 – 105. 2007.
- PETRUNKINA, A. M.; GRÖPPER, B.; TÖPFER-PETERSEN, E.; GÜNZEL-APEL. A.-R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, p. 1390-1406, 2005.
- PIEAU, C., M. DORIZZI, N. RICHARD-MERCIER. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. **EXS** 117-141, 2001
- PINKEL, D.; LAKE, L.; GLEDHILL, B. L.; VAN DILLA, M. A.; STEPHENSON, D.; WATCHMAKER, G. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. **Cytometry**, v. 3, p. 1-9, 1982.
- PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Modulation of bovine sperm signaling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 511-524, 2009a.
- PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 525-537, 2009b.

- RATH, D.; JOHNSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted sêmen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 338-346, 2008.
- RATH, D.; MOENCH-TEGEDER, G.; TAYLOR, U.; JOHNSON, L. A. Improved quality of sex sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. **Theriogenology**, v. 71, p. 22-29, 2009.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.
- RENS, W.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y Chromosome bearing sperm. **Cytometry**, v. 33, p. 476 – 481, 1998.
- REVELL S.G.; and MODRE G.A. An osmotic resistance stress for bovine bovine sêmen. **Animal Reproduction Science**. v 36, p 77 – 86, 1994
- RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical settings on canine sêmen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v. 60, p. 1553-1568, 2003.
- ROTA, A.; PENZO, N; VICENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology** v 53: p.1415-1420, 2000.
- RUVUNA, F.; TAYLOR, J.F.; WALTER, J.P. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1091-97, 1992.
- SALVADOR, D.F. **Perfis andrológicos, de comportamento sexual e desempenho reprodutivo de touros Nelore desafiados com fêmeas em estro sincronizado**. 2001. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1-7, 2004.
- SANTOS, G. C. J. Congelabilidade do sêmen equino em diferentes diluidores. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003
- SARTORI, R; SOUZA, A.H; GUENTHER, J.N; CARAVIELLO, D.Z; GEIGER, L.N; SCHENK, J.L; WILTBANK M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction** ., v.1, n.1, p.86-90, 2004

SEIDEL JR., G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; DOYLE, S. P.; BRINK, Z.; GREEN, R. D. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-20, 1999.

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

SEIDEL JR., G. E.; GARNER, D. L. Sexing mammalian sperm by flow cytometry. **Reproduction**, v. 124, p. 733-743, 2002b.

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

SEIDEL JR., G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443-6, 2007.

SEIDEL JR, G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminated and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v 105, p. 129-138, 2008.

SEIDEL JR., G. E. Sperm sexing technology – The transition to commercial application – An introduction to the symposium “Update on sexing mammalian sperm”. **Theriogenology**, v. 71, p. 1-3, 2009.

SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN C.R and SHORT, R.V. **Germ cells and fertilization**. Cambrige: Cambrige University Press, 1993. P. 63-101.

SHARPE, J. C.; EVANS, K. M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4-10, 2009.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; CRAN, D. G.; SEIDEL JR., G. E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375-1391, 1999.

SCHENK JL, BRINK Z, SUH TK. Use of competitive fertilization to evaluate a simpler laser for flow cytometric sexing of bovine sperm. **Reproduction Fertility Development**; v.17 p 306, 2005

SHENCK, J.L.; CRAN, D.G.; EVERESTT, RW.; SEIDEL JT, G.E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminated sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, p. 717-728, 2009.

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

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p. 609-619, 2007.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SOUZA, A.H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; MONSON, R.; WILTBANK, M.C. Effect of sêmen source and dose FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**, v. 4, p. 70 – 76, 2007.

SPINNACI, M.; VOLPE, S.; BERNARDINI, C.; DE AMBROGI, M.; TAMANINI, C.; SEREN, E. GALEATI, G. Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and Hsp90 in boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 899-907, 2006.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. S Efecto de los procesos de criopreservacion sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**. V.25, n.2, p.28 – 35, 2005.

SUAREZ, S.S; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v.12, n.1 p. 23–37, 2006

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL JR, G. E. High pressure flow cytometric sorting damage sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035-1048, 2005.

TANNO, P.H. Estudo **das alterações morfo-funcionais de espermatozóides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. 100 f. 2009

TARDIF, A.L.; FARRELL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial sêmen quality and changes during storage at 5° C. **Journal of Dairy Science**, v 80, p 487-490, 1992.

TARDIF A.L., FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial sêmen quality and changes during storage at 5 C. **Journal of Dairy Science**, v 80, p. 1606-1612, 1997.

TARTAGLIONE CM, RITTA MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen–thawed bull sêmen. **Theriogenology** v 62: p 1245–52. 2004

TAYLOR, S.C.S; MOORE, A.J.; THIESSEN, R.S; BAILEY, C.S. Efficiency of food utilization in traditional and sex controlled systems of beef production. **Animal Production** v 40 p 401 – 440, 1985

THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 1531-1550, 2006.

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

THOMPSON, L.A.; BROOK, P.F.; WARREN, M.; BARRAT, C.; COOKE, I.A. Morphometry comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen – thawed human zona – bound and unbound sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 15, p. 337-342, 1994.

UNANIAN, M.M. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,. 21p. Documentos 56. 2000

UNDERWOOD S.L. BATHGATE , R. EBSWORTH M, . MAXWELL ., W.M.C A, EVANS G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex- sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Animal Reproduction Science** v.118, p. 7–12, 2010

URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17-26, 2003.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

VAN DER VEN HH, JEYENDRAN RS, AL-HASANI S, PEREZ-PELAEZ M, DIEDRICH K, ZANEVELD LID. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. **Journal of Andrology** v;7 p:190-196. 1986

VAN VLECK, L.D; EVERETT R.W. Genetics value of sexed sêmen to produce dairy heifers. **Journal of Dairy science**. v. 59 p. 1802 – 1807. 1976

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**. New York. Academic Press, 1981, p.221-42.

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.

VAN MUNSTER E.B, STAP J, HOEBE R.A, T.E MEERMAN G.J, ATEN J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. **Theriogenology**; v.52 ,p.1281-1293,1999

- VARNER, D.D; VAUGHAN, S.D; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. **American Journal of Veterinary. Research.**, v 53, p. 224 – 230, 1991
- VERSTEGEN, J; IGUER- OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in Andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosoma reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 175-194, 1997.
- VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P. Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129-1137, 1995.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- 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 sêmen. **Animal Reproduction Science.**, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- WEIGEL, K. A. Exploring the role of sexed sêmen in dairy production systems. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. E120-E130, 2004. Supplement.
- WELCH, G.R.,WALSBIESER, G.C.,WALL, R.J., JOHNSON, L.A. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. **Animal Biotechnology**. v. 6, p. 131–139, 1995
- WERTHEIMEIR, E. V.; SALICIONI, A. M.; LIU, W.; TREVINO, C. L.; CHAVEZ, J.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; DARSZON, A.; VISCONTI, P. E. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 35539-35550, 2008.
- WHEELER, M. B.; RUTLEDGE, J. J.; FISHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D. J. Aplication of sexed sêmen technology to in vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219-227, 2006.
- ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v.60, p.1657-1663, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

Setup para análise do sêmen bovino: ajuste do aparelho Hamilton Thorne Biosciences.

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	30
Taxa de aquisição das imagens.....	60 Hz
Contraste mínimo da célula.....	50
Tamanho mínimo da célula.....	6 pixels
Contraste para células imóveis.....	30
Retinearidade.....	60%
Valor de corte de VAP para células lentas.....	30,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas.....	40,0 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte de VSL para células lentas.....	20,0 $\mu\text{m/s}$
Tamanho da célula.....	6 pixels
Intensidade da célula.....	80
Tamanho da cabeça estática.....	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática.....	0,56 a 1,20
Alongamento estático.....	8 a 92
Aumento.....	1,89
Frequência de vídeo.....	60
Intensidade de Iluminação.....	2203
Temperatura.....	37°C