Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo

José de Oliveira Carvalho Neto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba

2013

José de Oliveira Carvalho Neto

Médico Veterinário

Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador.

Prof. Dr. **Roberto Sartori Filho**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Carvalho Neto, José de Oliveira
Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo / José de Oliveira Carvalho Neto.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
98 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Reprodução 2. Fecundação 3. Bovinos 4. Biotecnologia I. Título

CDD 636.20824
C331a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família, especialmente aos meus pais, Joaquim e Ana, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito da dedicação constante no presente. Dedico a vocês minha conquista, com a mais profunda admiração, respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai por despertar em mim esta paixão. A minha mãe, que sempre me guiou serena e sabiamente. As minhas três irmãs que sempre me incentivaram e acreditaram.

Ao brilho nos olhos do meu avô que se alegra e me motiva em cada visita.

Aos meus padrinhos, que há muito são considerados como pais.

Ao meu sobrinho Joaquim, que ainda inconsciente da importância, me alegra e descontrai com suas brincadeiras.

À co-orientadora, Margot Alves Nunes Dode, por tanto se dedicar e acreditar em mim com seus ensinamentos, orientação, paciência e estímulo.

Ao orientador Roberto Sartori Filho, pela oportunidade concedida, me acolhendo sinceramente desde o princípio e orientando nos momentos necessários.

Aos pesquisadores Maurício Machaim Franco, pela orientação em parte do trabalho e paciência em minhas muitas perguntas e Eduardo de Oliveira Mello, pela ajuda e discussões dentro do laboratório.

Á Fernanda C. Rodrigues, Leandro Rodello, Luciano Paulino Silva, Gerson Barreto Mourão, Otávio Bravin, Valquíria A. Michalczechen-Lacerda, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Professor Alireza Fazeli, da University of Sheffield - UK, por ter me recebido em seu laboratório durante um período de estágio sanduíche.

Aos amigos espanhóis, Ignácio Caballero, Carmem Alminaña e Manuel Álvarez Rodrigues, por terem sodo companheiros e amigos durante minha estadia na Inglaterra.

Ao Professor David Miller e ao Ph.D Sérgio Machado, da University of Illinois - USA, por terem me recebido em seu laboratório e auxiliado no desenvolvimento da técnica para o teste de ligação dos espermatozoides as células da tuba uterina.

As amigas de pós graduação Allice R. Ferreira, Fernada Zinzly, Maria Clara Costa Mattos, Michele Bastos, Juliana Mayumi e Rosana Nishimura pelos momentos juntos em viagens, palestras, aulas, laboratório e no dia a dia, como companheiras nas alegrias e dificuldade de cada etapa vencida.

Aos amigos pós-graduandos e graduandos Alexandre Prata, Amanda Lemes, Ana Guimaraes, Andrei Fidelis, Andrielle Mendes, Anelise Mendonça, Eleonora Araújo, Heitor Teixeira, Isabela Bessa, José Spricigo, Matheus Diógenes, Monique Guardieiro, Ricardo Surjus, Tiago Braga e Valquíria Lacerda, cujo convívio proporcionou momentos de alegria, mas também de aprendizado para o crescimento pessoal e profissional.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte na realização deste trabalho.

Aos Professores Sony Dimas Bicudo e Fernanda da Cruz Landim por terem cedido seus laboratórios para realização de parte deste trabalho.

À Universidade de São Paulo pelo curso oferecido.

A FAPESP pela bolsa de estudos (processo número 2010/00585-0) e pelo auxílio na realização do projeto (processo número 2010/15054-0).

A todos aqueles que de alguma forma estiveram juntos durante este período, e que não tiveram os nomes citados nestas linhas. Tenham certeza que lhes sou muito grato.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....13

ABSTRACT.....15

1 INTRODUÇÃO.....17

Referências.....19

2 SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NÃO AFETA O PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES IGF2 E IGF2R.....23

Resumo.....23

Abstract.....24

2.2 Introdução.....25

2.2 Material e métodos.....27

2.2.1 Amostras de sêmen.....27

2.2.2 Preparação da amostra.....28

2.2.3 Extração de DNA.....28

2.2.4 Tratamento com Bisulfito de Sódio.....29

2.2.5 Amplificação em PCR, clonagem e sequenciamento.....29

2.2.6 Análise estatística.....30

2.3 Resultados.....30

2.4 Discussão.....34

2.5 Conclusão.....36

Referências.....36

3 DIFERENÇAS NANOMÉTRICAS NA FORMA E TAMANHO DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS CONTENDO CROMOSSOMO X OU Y AVALIADOS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....41

Resumo.....41

Abstract.....42

3.1 Introdução.....43

3.2 Material e métodos.....45

3.2.1 Separação dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y.....45

3.2.2 Preparação dos espermatozoides para avaliação em microscopia de força atômica.....45

3.2.3 Análise das amostras em microscopia de força atômica.....46

3.2.4 Fórmulas matemáticas utilizadas para gerar os descritores de forma.....47

3.2.5 Análise estatística.....48

3.3 Resultados.....48

3.4 Discussão.....52

3.5 Conclusão.....56

Referências.....56

4 SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO ALTERA CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À VIABILIDADE ESPERMÁTICA E COMPROMETE SUA LIGAÇÃO ÀS CÉLULAS DA TUBA UTERINA.....61

Resumo.....61

Abstract.....62

4.1 Introdução.....63

4.2 Material e métodos.....65

4.2.1 Delineamento experimental.....65

4.2.2 Amostras de sêmen.....66

4.2.3 Preparação e incubação dos espermatozoides em meio de cultivo.....66

3.2.4 Avaliação de motilidade e motilidade progressiva.....66

4.2.5 Avaliação dos espermatozoides em citômetro de fluxo.....67

4.2.6 Coleta e processamento das células da tuba uterina.....67

4.2.7 Avaliação do número de espermatozoides ligados às células da tuba uterina.....68

4.2.8 Análise estatística.....70

4.3 Resultados.....70

4.3.1 Avaliação da cinética espermática em meio de cultivo.....70

4.3.1.1 Motilidade e motilidade progressiva.....70

4.3.1.2 Potencial de membrana mitocondrial e estabilidade de membrana plasmática.....72

4.3.1.3 Integridade de membrana e acrossomal.....75

4.3.1.4 Capacidade de ligação do espermatozoide sexado as células da tuba uterina.....77

4.4 Discussão.....79

4.5 Conclusão.....84

Referências.....84

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....91

ANEXOS.....95

RESUMO

Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo

A sexagem espermática tem um grande impacto na produção animal, pois permite a escolha do sexo dos descendentes, tendo o seu uso aumentado consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, as taxas de blastocistos produzidos in vitro com sêmen sexado são semelhantes às com sêmen não sexado. Entretanto, quando utilizado na inseminação artificial (IA) e/ou transferência de embriões (TE) as taxas de gestação ou produção de embriões ainda são inferiores às obtidas com sêmen convencional. Esses resultados indicam que são necessários mais esclarecimentos sobre o efeito da sexagem nas células espermáticas. Este estudo teve o objetivo de avaliar possíveis alterações moleculares e funcionais dos espermatozoides causadas pelo processo de sexagem, além de tentar identificar diferenças entre espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y. Para isto, um ejaculado de cada touro Nelore (n=4) foi colhido e separado em três frações: não sexado (NS), sexado X (SX) e sexado Y (SY), sendo utilizado em 3 experimentos. Nos experimentos 2 e 3, um quarto grupo foi formado pelo pool de espermatozoides sexados X e Y (XY). No primeiro experimento, utilizando a técnica de bisulfito de sódio, foi realizada a avaliação do padrão de metilação dos genes imprinted IGF2 e IGF2R em espermatozoides sexados e não sexados. No segundo experimento, foi avaliado o efeito da sexagem no tamanho e na forma da cabeça do espermatozoide e as possíveis diferença entre espermatozoides contendo cromossomo X ou Y. No último experimento, verificou-se o efeito da sexagem espermática na longevidade dos espermatozoides mantidos em meio de cultivo por 12 horas e na sua capacidade de se ligar às células da tuba uterina (CTU). No experimento relacionado à epigenética, não foi encontrada diferença no padrão de metilação dos genes IGF2 e IGF2R. Entretanto, identificou-se um polimorfismo no gene IGF2, e um padrão de metilação específico do gene IGF2R, provavelmente devido a uma característica epigenética especifica de animais *Bos indicus*. No experimento 2, não foi encontrada diferença em nenhuma das 23 variáveis estudadas entre os grupo X e Y. Entretanto, usando simultaneamente diversos parâmetros por meio de análise discriminante, na tentativa de diferenciar os grupos, o modelo mais discriminante atingiu 100% de precisão na identificação de espermatozoides de cada grupo NS, SX, SY e SXY. No experimento 3 foi identificado que o processo de sexagem afeta características estruturais da célula espermática, induzindo umacapacitação e reação acrossômica. Porém, ao longo de 12 horas de cultivo, a cinética dos espermatozoides sexados foi semelhante a do sêmen convencional. Além disto, foi identificado que o processo de sexagem comprometeu a capacidade dos espermatozoides de se manterem ligados às CTU. Em relação aos espermatozoides X e Y, foi observada uma menor capacidade do grupo X de se ligar às CTU, assim como uma diferença em características relacionadas à motilidade e acrossoma. Esses resultados podem contribuir no estabelecimento de procedimentos mais adequados para melhorar o aproveitamento e os resultados quando da utilização do sêmen sexado e em melhorias no processo de sexagem, ou mesmo no desenvolvimento de novas tecnologias para a separação de espermatozoides X ou Y.

Palavras-chave: Reprodução, fecundação, bovino, biotecnologia

ABSTRACT

Molecular, structural and functional characteristics of the bovine sperm sexed by flow citometry

Sperm sorting can have a great impact on breeding programs because it allows sex selection of the offspring, being its use increased considerably in last few years. Currently the rate of in vitro produced blastocyst using sexed sperm is similar to that obtained with no sexed sperm. However, lower rates of pregnancy and blastocyst are observed when sexed sperm are used for artificial insemination or embryo transfer compared to the conventional sperm. These results suggest that further studies are needed to clarify the effects of sexing process on sperm cells. This study aimed to evaluate molecular and functional changes caused by the sorting process, as well as to identify possible differences between sperm containing the X or Y chromosome. Each ejaculate of Nelore bulls (n=4) was collected and separated into three fractions: non-sexed (NS), sexed for X-sperm (SX), and sexed for Y-sperm (SY), being used in 3 experiments. For the experiment 2 and 3 a fourth group was formed by pooling SX and SY samples (SXY). On the first experiment, methylation pattern of the IGF2 and IGF2R imprinted gene in sexed and non sexed sperm was assessed using sodium bisulfite method. On the experiment 2, we evaluated whether sexing by flow cytometry changes the shape and size of the sperm head, and if these measurements differ between cells that bearing the X or Y chromosome. In the last experiment, the effect of sorting process on sperm longevity during 12 h incubation and their ability to bind to oviduct cells were evaluated. In the experiment related to methylation patterns, sex-sorting procedures have not affected DNA methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes. However, a polymorphism was found in IGF2 gene, and a very specific methylation patterns was observed in the IGF2R gene, probably due to an epigenetic characteristic in *Bos indicus* cattle. On experiment 2, no differences between X and Y sperm group were observed for any of the studied characteristics. However, using different parameters simultaneously in discriminator analysis, in an attempt to differentiate groups, the greatest discriminator model had 100% accuracy to identify the sperm from NS, SX, SY and SXY group. On experiment 3, it was identified that sorting process affected structural sperm characteristics, inducing a pre capacitation status and acrosome reaction. However, after 12 hours of incubation the kinetics of the sexed sperm was similar to the non sexed sperm. Furthermore, sexing process affected the ability of sperm to maintained bound to the oviduct cells. Regarding X and Y sperm, it was observed that X group had a lower ability to bind to the CTU, being the X sperm more susceptible to sorting process than the Y sperm. These results can contribute to improve the use and results of the sexed sperm, as well as to induce enhancements in the sexing process, or even to develop new technologies for separation of X or Y sperm cell.

Keywords: reproduction, fertilization, bovine, biotechnology

1 INTRODUÇÃO

A separação dos espermatozoides portadores do cromossomo sexual masculino (Y) e do feminino (X) é uma alternativa extremamente interessante, principalmente para a indústria de produção animal. Esse procedimento permite uma maior eficiência na produção e maior flexibilidade no manejo do rebanho Além disto, permite o nascimento de fêmeas ou machos, dependendo da demanda do mercado, resultando também em um maior ganho econômico. Estas vantagens têm feito com que o uso de espermatozoides sexados tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos. No entanto, a aplicabilidade comercial dessa técnica depende do estabelecimento de uma metodologia que, minimize a perda de espermatozoides durante a sexagem, não reduza o poder fecundante dos mesmos, além de ser compatível com o processo de criopreservação.

Para a sexagem espermática, diversas técnicas foram testadas a fim de tornar o processo mais eficaz e viável comercialmente. Estas técnicas foram baseadas em características dos espermatozoides tais como: sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960), carga elétrica da superfície da membrana (KANECO et al., 1984), morfologia do núcleo e cabeça (SHETTLES, 1960), antígenos de superfície (KOO et al., 1973) e diferença no conteúdo de DNA (JOHNSON et al., 1987; JOHNSON; FLOOK; HAMK, 1989). Entretanto, até o presente, somente o procedimento em que a separação é feita por citometria de fluxo tem se mostrado eficaz para uso comercial. Esse método baseia-se na diferença do conteúdo de DNA dos espermatozoides, em que o cromossomo X do bovino contém em torno de 4% a mais de DNA, do que o cromossomo Y (GARNER et al., 1983).

Atualmente o emprego do sêmen sexado na reprodução de bovinos vem crescendo ao longo dos anos. Parte desde crescimento é devido a sua ampla utilização na produção in vitro de embriões (PIVE). Isso porque na PIVE é possível utilizar um menor número de espermatozoides para fecundar um grande número de ovócitos, otimizando o uso de uma dose de sêmen sexado, que além de apresentar menor porcentagem de células viáveis, também apresenta menor concentração de células/dose. Além disto, as melhorias no processo de sexagem (SHARPE; EVANS, 2009) e alterações nos protocolos de PIVE ou preparação espermática (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; VILLAMIL et al., 2012) tem permitido uma melhora nas taxas de blastocisto quando se utiliza sêmen sexado, alcançando taxas semelhantes as do sêmen não sexado (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Entretanto, quando o sêmen sexado é utilizado na inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) as taxas de gestação ou produção de embriões são inferiores quando comparadas às obtidas com sêmen não sexado (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013). Esses resultados sugerem que os danos causados nos espermatozoides pelo processo de sexagem (BLONDIN et al., 2009, CARVALHO et al., 2010) possam não ser tão cruciais para as condições in vitro, em que altas concentrações de espermatozoides são colocados diretamente em contato com o ovócito. Entretanto, o processo de sexagem poderia gerar alterações nos espermatozoides, que comprometam o desenvolvimento embrionário ou a sua fertilidade in vivo, tais como alterações do DNA. Danos no DNA espermático podem ser causados por compactação anormal da cromatina, fragmentação de DNA e defeitos epigenéticos (TAVALAEE; RAZAVI; NASR-ESFAHANI, 2009). Dentre estes, problemas epigenéticos tais como uma alteração no padrão de metilação do DNA, podem não comprometer a capacidade de fecundação, mas poderiam prejudicar a reprogramação nuclear dos embriões, gerando problemas no desenvolvimento e implantação. Além disto, as alterações na estrutura do espermatozoide causada pelo processo de sexagem poderiam prejudicar a sobrevivência deste espermatozoide após a descongelação, assim como a capacidade de formar os reservatórios espermáticos na tuba uterina. O comprometimento destas características fundamentais para a fecundação in vivo, poderiam ser um dos responsáveis pelas menores taxas de gestação quando se utiliza o sêmen sexado na IA.

Adicionalmente, novas tecnologias que vem sendo desenvolvimento, como a nanotecnologia, podem ser utilizadas na tentativa de identificar outras diferenças entre espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y, além da já conhecida diferença na quantidade de DNA.

Desta forma, são necessários estudos para verificação de possíveis alterações dos espermatozoides causadas pelo processo de sexagem, além das alterações estruturais já conhecidas, tais como alterações moleculares e funcionais, assim como a identificação de outras diferenças presentes entre espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y. Esses conhecimentos podem contribuir para estabelecer procedimentos mais adequados para melhorar o aproveitamento e os resultados quando da utilização deste sêmen, assim como

melhorias no processo de sexagem, ou mesmo o desenvolvimento de novas tecnologias para a separação de espermatozoides X ou Y.

Referências

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

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,** New York, v. 71, p. 30-38, 2009.

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

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURAO, G.B.; DODE, M.A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology,** New York, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

DEJARNETTE, J.M.; LEACH, M.A.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MCCLEARY, C.R.; MORENO, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 94, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J.M.; MCCLEARY, C.R.; LEACH, M.A.; MORENO, J.F.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 93, p. 4079-4085, 2010.

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,** Madson, v. 28, p. 312-321, 1983.

EMMENS, C.W. Insemination pH and the sex ratio in rabbits.**Journal Herald**, v. 51, p. 156-157, 1960.

HEALY, A.A.; HOUSE, J.K.; THOMSON, P.C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 96, p. 1905-1914, 2013.

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

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V.; PINKEL, D. Flow sorting of X and Y chromosome bearing into two populations.**Gamete Research**, New York, v. 16, p. 1-9, 1987.

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

KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E.A.; HÄMMERLING, U. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Production National Academy Science**, New York, v. 70, p. 1502-1505, 1973.

MELLADO, M.; CORONEL, F.; ESTRADA, A.; RIOS, F.G. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. **Tropical Animal Health Production,** Edinburgh, v. 42, p. 1493-1496, 2010.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RATY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMAKI, H.; SAIRANEN, A.; MAKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 111, p. 80-92, 2009.

VILLAMIL, R.P.; WEI, H.; MOREIRA, G.; CACCIA, M.; FERNANDEZ TARANCO, M.; BO, G.A. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology,** New York, v. 78, p. 165-171, 2012.

SALES, J.N.; NEVES, K.A.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SA FILHO, M.F.; BARUSELLI. P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology,** New York, v. 76, p. 427-435, 2011.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; 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,** Belo Horizonte, v. 1, p. 86-90, 2004.

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

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

SHETTLES, L.B. Nuclear structure of human spermatozoa.**Nature**, London, v. 188, p. 918-919, 1960.

TAVALAEE, M.; RAZAVI, S.; NASR-ESFAHANI, M.H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertility and Sterility,** New York, v. 91, p. 1119-1126, 2009.

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

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE. R.; MAXWELL. W.M.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 118, p. 171-175, 2010b.

2 SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NÃO AFETA O PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES IGF2 E IGF2R

Publicado em:

CARVALHO, J.O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; SARTORI, R.; RODRIGUES, F.C.; BRAVIM, O.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development,** New York, v. 79, p. 77-84, 2012.

Resumo

O processo de sexagem por citometria de fluxo expõe os espermatozoides a vários fatores que poderiam causar alterações epigenéticas tais como o padrão de metilação do DNA. Essas alterações podem não afetar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, mas podem afetar o desenvolvimento embrionário posterior e a placentação. Objetivou-se avaliar o efeito da sexagem por citometria de fluxo no padrão de metilação da região diferencialmente metilada do último éxon do gene IGF2 e da região controladora de imprinting do gene IGF2R. Um ejaculado de cada touro Nelore (n=4) foi colhido e separado em três frações: não sexado (NS), sexado X (SX) e sexado Y (SY). Para cada grupo o DNA genômico foi extraído, tratado com bisulfito de sódio, amplificado por PCR, clonado, transformado em *E.coli* e sequenciado para avaliação do padrão de metilação. Para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). O padrão de metilação do DNA foi semelhante entre os grupos NS (96,4±0,4 e 7,2±0,6%), SX (95,4±0,4 e 8,0±0,6%) e SY (96,9±0,4 e 8,0±0,6%) para os genes IGF2 (n=195 sequências) e IGF2R (n=150 sequências), respectivamente. Para o gene IGF2R, foi encontrado um padrão de metilação específico nas CpGs 25 e 26, com alta metilação nos grupos NS (86,4 e 84,1%), SX (86,2 e 81,0%) e SY (89,6 e 62,5%), diferente do padrão de metilação já relatado para essa região em espermatozoide. Além disso, a porcentagem de metilação na CpG 26 foi menor no grupo SY do que nos grupos NS e SX. Para o gene IGF2, após seqüenciamento dos clones, foram identificadas 28 CpGs em cada clone, diferente das 27 CpGs encontradas em outros estudos com *Bos taurus*. Ao se comparar o padrão de metilação entre os tratamentos para cada touro individualmente, o touro 3 apresentou maior

porcentagem de metilação no grupo SY do que SX para o gene IGF2. Já na comparação entre touros para cada tratamento, foi observado um efeito de touro no padrão de metilação do gene IGF2R para o grupo SY, sendo que os touros 1 e 3 (6,1±0,7 e 6,4±0,6%) apresentaram menor porcentagem de metilação do que os touros 2 e 4 (9,9±1,8 e 9,6±1,3%). Conclui-se que o processo de sexagem por citometria de fluxo não afetou o padrão de metilação dos genes IGF2 e IGF2R. Entretanto, observou-se variação individual de touro no padrão de metilação para ambos os genes. Além disso, identificou-se um polimorfismo no gene IGF2, e um padrão de metilação específico do gene IGF2R, provavelmente devido a uma característica epigenética especificas de animais *Bos indicus*.

Palavras-chave: Bovino, Molecular, Fecundação, Sêmen

Abstract

The process of sexing by flow cytometry exposes sperm to factors that can cause epigenetic changes, such as the methylation pattern of the DNA. These changes may not affect development until the blastocyst stage but can explain later problems in embryo development and failures in plancentation. These problems are common in clone embryos, with higher embryonic loss between Days 30 and 90 of gestation due to abnormal methylation of DNA. The objectives were to investigate the effect of sexing by flow cytometry on the methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes. Each ejaculate of Nelore bulls (n=4) was collected and separated into three fractions: non-sexed (NS), sexed for X-sperm (SX), and sexed for Y-sperm (SY). Frozen-thawed sperm cells were used for genomic DNA isolation that was then treated with sodium bisulfite in three different replicates. Treated DNA was used for PCR amplification, which was cloned, transformed into *E. coli* and sequenced for analyses of the methylation patterns. For comparisons among groups, the Kruskal-Wallis test was performed ($P<0.05$). No differences in DNA methylation were found among NS (96.4±0.4 and 7.2±0.6%), SX (95.4±0.4 and 8.0±0.6%) and SY (96.9±0.4 and 8.0±0.6%) groups for IGF2 (n=195 sequences) and IGF2R (n=150 sequences) genes, respectively. However, for the IGF2R gene, a very specific methylation pattern was observed in the 25th and 26th CpG sites, which were highly methylated in the NS (86.4 and 84.1%), SX (86.2 and 81.0%) and SY (89.6 and 62.5%) groups, differently from the pattern expected for this region in sperm. Furthermore, the percentage of methylation on the 26th CpG site was lower in the SY group than NS and SX groups. In addition, after DNA sequencing, we identified 28 CpG sites in each clone of the IGF2 gene, which was different from the 27 CpGs reported by other

studies in *Bos taurus*. When the methylation pattern between treatments was compared for each individual bull, bull 3 had a higher percentage of methylation in the SY group than in the SX, for the IGF2 gene. However, when comparing bulls for each treatment, we observed an effect of bull in the methylation of the gene IGF2R for the SY group. Bulls 1 and 3 (6.1±0.7 and 6.4±0.6%) had a lower percentage of methylation in comparison to bulls 2 and 4 (9.9±1.8 and 9.6±1.3%). In conclusion, the sex-sorting procedure by flow cytometry did not affect the DNA methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes. However, there was a bull variation in the methylation pattern. Furthermore, a polymorphism was found in IGF2 gene, and a very specific methylation patterns was observed in the IGF2R gene, probably due to an epigenetic characteristic in *Bos indicus* cattle.

Keywords: Bovine, Molecular, Fertilization, Semen

2.1 Introdução

Embora o uso de sêmen sexado possa ter um grande impacto na pecuária, o alto custo e as reduzidas taxas de gestação ainda são fatores limitantes para um maior uso na indústria animal. De fato, baixas taxas de gestação na inseminação artificial (IA) e em programas de transferência de embriões (TE) usando sêmen sexado por citometria de fluxo, têm sido relatadas (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013). Da mesma forma, alguns autores também têm observado baixas taxas de blastocisto produzidas in vitro quando sêmen sexado é utilizado (MORTON et al., 2007; BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008, 2010). Estes resultados sugerem que o processo de sexagem por citometria de fluxo pode causar danos aos espermatozoides, o que poderia ser devido á exposição ao laser, grande pressão na passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e/ou permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes de ser processado. Estes fatores podem causar danos estruturais nos espermatozoides (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010), tais como danos do DNA, o que poderia afetar o desenvolvimento embrionário.

Danos no DNA espermático podem ser causados por compactação anormal da cromatina, fragmentação de DNA e defeitos epigenéticos (TAVALAEE; RAZAVI; NASR-ESFAHANI,

2009). Entretanto, avaliação da fragmentação de DNA tem sido o único método utilizado para avaliar o efeito da sexagem por citometria de fluxo na integridade da cromatina (BOE-HANSEN et al., 2005; BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; GOSALVEZ et al., 2011), não havendo estudos que avaliem possíveis mudanças epigenéticas que possam ocorrer após esse processo.

Epigenética refere-se aos processos que regulam a atividade gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis através das divisões celulares (LUCIFERO et al., 2004). A regulação epigenética é caracterizada por uma série de modificações, que incluem a metilação do DNA (BIRD, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003) e modificações das histonas, tais como acetilação, fosforilação e metilação (RICHARDS; ELGIN, 2002; LEBEDEV; SAZHENOVAA, 2008). Em mamíferos, a correta reprogramação da metilação do DNA e manutenção do imprinting genômico durante a gametogênese são essenciais para o correto desenvolvimento embrionário, implantação do embrião (NEWELL-PRICE; CLARK; KING, 2000) e manutenção da gestação (LUCIFERO et al., 2004). A metilação do DNA constitui uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas sendo a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações, influenciando na regulação da expressão gênica (BIRD, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003). Além disto, a metilação do DNA é o maior exemplo da contribuição epigenética do núcleo do espermatozoide para o desenvolvimento embrionário, sendo que qualquer alteração deste DNA pode comprometer o desenvolvimento embrionário (CARREL; HAMMOUND, 2010). A metilação do DNA geralmente ocorre em regiões ricas em dinucleotídeos CpGs (BIRD, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003), os quais são localizados dentro de regiões promotoras, de regiões diferencialmente metiladas (DMR) ou de regiões controladoras de imprinting (ICR).

Dois importantes genes imprinted são o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF2) e o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF2R), localizados no cromossomo 29 e 9 no genoma bovino, respectivamente. Ambos os genes são relacionados com desenvolvimento embrionário e placentação (CURCHOE et al., 2005; PERECIN et al., 2009). O IGF2 é predominantemente expresso pelo alelo paterno e silenciado no alelo materno (FEIL et al., 1994). Isto indica a presença de uma região intragênica DMR, com alto nível de metilação de DNA no espermatozoide e baixos níveis de metilação no ovócito (GEBERT et al., 2006), enquanto o gene IGF2R é controlado por uma ICR, sendo expresso pelo alelo materno (ZWARD et al., 2001).

Vários estudos relatam que técnicas de reprodução assistida (ARTs), incluindo transferência nuclear, fecundação in vitro, injeção intra citoplasmática, criopreservação e cultivo embrionário in vitro, estão associadas com alterações na metilação dos genes IGF2 e IGF2R (CURCHOE et al., 2005; GEBERT et al., 2009; LONG; CAI, 2007; POPLINSKI et al., 2010). Estas mudanças podem resultar em desenvolvimento anormal, já que a aquisição e manutenção do imprinting genômico é crítico para o desenvolvimento embrionário inicial e manutenção da gestação (LUCIFERO et al., 2004).

No entanto, a maioria dos estudos relaciona alterações no padrão de metilação com a produção de embriões in vitro (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008b) ou por transferência nuclear (KANG et al., 2001; GEBERT et al., 2009). Portanto, como a sexagem pode causar vários danos aos espermatozoides, foi hipotetizado que o processo de sexagem por citometria de fluxo pode induzir alterações no padrão de metilação do DNA espermático, comprometendo a correta manutenção do imprinting genômico dos embriões. Sendo assim, este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito da sexagem por citometria de fluxo no padrão de metilação dos genes IGF2 e IGF2R.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostras de sêmen

O sêmen utilizado neste estudo foi obtido de quatro touros da raça Nelore e sexualmente maduros. Um ejaculado de cada touro foi coletado utilizando vagina artificial, sendo utilizado apenas os ejaculados com motilidade >60% e anormalidades morfológicas <20%. Após a colheita, cada ejaculado foi dividido em três frações. Uma fração foi utilizada como sêmen não sexado (NS), e as outras duas frações foram submetidas ao processo de sexagem espermática por citometria de fluxo, para produzir amostras de sêmen contendo cromossomo X (SX) e Y (SY). A fração relativa à amostra NS foi congelada utilizando diluente tris e 4% de gema de ovo, sendo refrigeradas à 4 ºC por 90 min e então diluídas em Bioxcell® (IMV, L´Aigle, França) e congeladas em máquina de congelação TK 3000 (TK, Uberaba, MG, Brasil). Ao final do programa de congelação, todas as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido.

A porção da amostra destinada para sexagem espermática foi diluída em uma concentração de 200 x 10^6 spermatozoides/mL em meio Tris, suplementado com 49-65 mM de Hoechst 33342 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR) e incubadas por 45 minutos a 34 ºC. Após incubação,

as amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com meio Tris, suplementado com 4% de gema de ovo e 0,0015% de *food dye* (FD&C #40; Warner Jenkinson Company Inc., St Louis, MO), e filtradas em filtro de 50 mm (GCTA, Fort Collins, CO) para remoção de debris ou células aglutinadas antes da sexagem. O citômetro de fruxo (MoFlo SX, Beckman Coulter, Fullerton, CA) foi configurado para trabalhar em 40 psi, com laser (Vanguard 350 HDM-355, Spectra Physics, Mountain View, CA) a 125 mW. Os campos de sexagem foram configurados para produzir uma pureza de 90%. Após a sexagem todas as amostras foram congeladas conforme especificado anteriormente para o grupo NS.

2.2.2 Preparação da amostra

Em todos os grupos, os espermatozoides foram separados do diluente, crioprotetor e outros tipos celulares por centrifugação em gradiente de Percoll (GE Healthcare Bio Science, Upsala, Sweden), como descrito por LALANCETTE et al. (2008). Resumidamente, uma palheta por grupo/touro foi descongelada e colocada sobre o gradiente de Percoll composto por 2 mL de Percoll 40:70% e centrifugado por 45 minutos a 700 g em temperatura ambiente.

2.2.3 Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado a partir do pellet obtido após passagem dos espermatozoides pelo gradiente de Percoll, utilizando protocolo *Sauting out* (BIASE et al., 2002). Resumidamente, 300 µL de solução de lise (50 mM Tris, pH 7,8, 5 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, e 2% SDS) com proteinase K (0,5 mg/mL) e 0,3% de β-mercaptoetanol foi adicionado ao pellet. Os espermatozoides foram mantidos em solução de lise por toda a noite a 55 ºC. O DNA genômico foi separado utilizando solução a 6 M de NaCl sendo posteriormente precipitado utilizando isopropanol. O pellet contendo DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% seguindo de secagem em ar por 10-15 minutos. O DNA foi ressuspendido em 30-50 µL de água deionizada, sendo armazenado em temperatura de -80 ºC até serem tratadas com bisulfito de sódio.

2.2.4 Tratamento com Bisulfito de Sódio

O DNA genômico (80 a 200 ng) foi tratado com bisulfito de sódio, utilizando kit de metilação EZ DNA (Zymo Research, Irvine, CA), seguindo protocolo do fabricante, exceto pela temperatura de conversão, que foi alterada para 55 ºC. Após o tratamento, as amostras foram eluidas em 10 µL de água destilada e mantidas a -80 ºC até a amplificação em PCR.

2.2.5 Amplificação em PCR, clonagem e sequenciamento

Foi utilizado PCR *nested* no DNA tratado com bissulfito de sódio para amplificação da DMR localizada no último éxon do gene IGF2 e da ICR localizada no intron 2 do gene IGF2R. Os primers utilizados para o gene IGF2 foram os descritos por Gebert et al. (2006), e a PCR foi realizada utilizando 1x Taq Buffer (Invitogen, São Paulo, Brasil), 2,0 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP, 10 pmoles de cada primer, 1U de Taq polimerase Platinum (Invitrogen), 3 µL de DNA tratado na primeira PCR e 0,5 µL de DNA para a segunda PCR, em volume final de 20 µL. Ambas as PCRs foram realizadas com temperatura de desnaturação de 94 ºC por 3 min, e posteriores 45 ciclos a 94 ºC por 40 s, 45 ºC (primeira PCR) ou 40 ºC (segunda PCR) por 1 min, 72 ºC por 1 min e extensão final a 72 ºC por 15 min. Para o gene IGF2R, os primer utilizados na primeira PCR foram descritos por Long e Cai (2007) e os primers para a segunda PCR foram desenhados no laboratório, sendo: forward 5´AAATGAAAGYAGTGAATTA3´e reverse 5´CCAACCRAACCRCTAACCCT3´. A PCR foi realizada utilizando 1x de Taq Buffer (Invitrogen), 2,0 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP, 10 pmoles de primers, 1U Taq polimerase Platinum (Invitrogen), 3 µL de DNA para a primeira PCR e 0,5 de DNA para a segunda PCR. Ambas as PCRs foram realizadas com temperatura de desnaturação de 94 ºC por 3 min, e posteriores 15 ciclos a 94 ºC por 40 s, 55 ºC (primeira PCR) ou 50 ºC (segunda PCR) por 1 min, 72 ºC por 1 min. Posteriormente, foram feitos mais 20 ciclos a 94 ºC por 40 s, 50 ºC (primeira PCR) ou 45 ºC (segunda PCR) por 1 min e 72 ºC por 1 min, com extensão final de 72 ºC por 15 min. Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose, sendo as bandas de cada produto, purificadas utilizando o GenClean III kit (MP Biomedicals, Solon, OH), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, os produtos purificados foram clonados em kit pGEMT-Easy vector (Promega Madison, WI, USA) e transformados utilizando *E. coli* (XL-1 Blue).

Clones individuais foram sequenciados utilizando dideoxy fluorescence terminator system (ABI 3130 xl). Apenas sequencias originadas a partir de clones com mais de 95% de citosinas convertidas foram utilizadas. Para cada touro, foram realizadas três (IGF2) ou duas (IGF2R) réplicas independentes de extração, tratamento com bisulfito de sódio, amplificação, clonagem e sequenciamento. O padrão de metilação foi determinado no programa BiQ Analyser software (BOCK et al., 2005), utilizando a sequencia do GeneBank (número de acesso NM_174087 e DQ835615 para os genes IGF2 e IGF2R, respectivamente). A porcentagem de metilação foi calculada contando o número de CpGs metiladas sobre o total de CpGs em cada clone.

2.2.6 Análise estatística

Para comparação do padrão de metilação dos diferentes tratamentos (NS, SX e SY) e touros (1, 2, 3 e 4) foi utilizado o teste Kruskal-Wallis do programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems e Technologies, 1996). O padrão de metilação da CpG 25 e 26 do gene IGF2R foi comparado utilizando teste Chi-quadrado. Os dados são apresentados como media ± erro padrão (EP), com nível de significância de $\alpha = 0,05$.

2.3 Resultados

Usando o método de sequenciamento quantitativo por bissulfito, foram avaliados uma região de dois genes imprinted metilada (IGF2) e não metilada (IGF2R) no alelo paterno.

O padrão de metilação da DMR do gene IGF2 e da ICR2 do gene IGF2R para todos os tratamentos são apresentados na Figura 1. Todas as sequencias avaliadas, em todos os tratamentos, apresentaram um padrão hipermetilado (≥50% das ilhas CpGs estavam metiladas) no gene IGF2 ou hipometilada (<50% das ilhas CpGs estavam desmetiladas) no gene IGF2R. Para o gene IGF2, foram avaliadas 195 sequencias com 28 ilhas CpGs em cada clone, não sendo encontrada diferença na metilação de DNA entre os grupos NS (96,4 ± 0,41%; n = 67 clones), SX (95,4 ± 0,46%; n = 67 clones) e SY (96,9 ± 0,38%; n = 61 clones) (Figura 1; P = 0.09).

Para o gene IGF2R, foram avaliados 150 sequencias com 26 ilhas CpGs em cada clone. Semelhante ao gene IGF2, não foi encontrada diferença no padrão de metilação entre os

grupos NS (7,2 ± 0,58%; n = 44 clones), SX (8,9 ± 0,64%; n = 58 clones) e SY (7,9 ± 0,46%; n = 48 clones) (Figura 1; P = 0.38). Entretanto, foi identificado um padrão de metilação específico nas ilhas CpGs 25 e 26 (Figura 1), as quais foram altamente metiladas no grupo NS (86,4 e 84,1%), SX (86,2 e 81,0%) e SY (89,6 e 62,5%), comparadas com outros ilhas CpGs. Além disto, a porcentagem de metilação da ilha CpG 26 foi menor no grupo SY do que nos grupos NS e SX (Figura 2).

Também foi comparado o padrão de metilação dos genes IGF2 e IGF2R entre tratamentos para cada touro individualmente e entre touros para cada tratamento. Para o gene IGF2, não houve diferença entre touros dentro do mesmo grupo (Tabela 1). Entretanto, o touro 3 apresentou alta porcentagem de metilação no grupo SY em relação ao grupo SX. Quando a mesma análise foi realizada para o gene IGF2R, não houve diferença entre os grupos NS, SX e SY para todos os touros (Tabela 2). Entretanto, foi encontrado efeito individual de touro no padrão de metilação do gene IGF2R para o grupo SY, com maior porcentagem de metilação dos touros 2 e 4 em relação aos touros 1 e 3 (Tabela 2 e Figura 2).

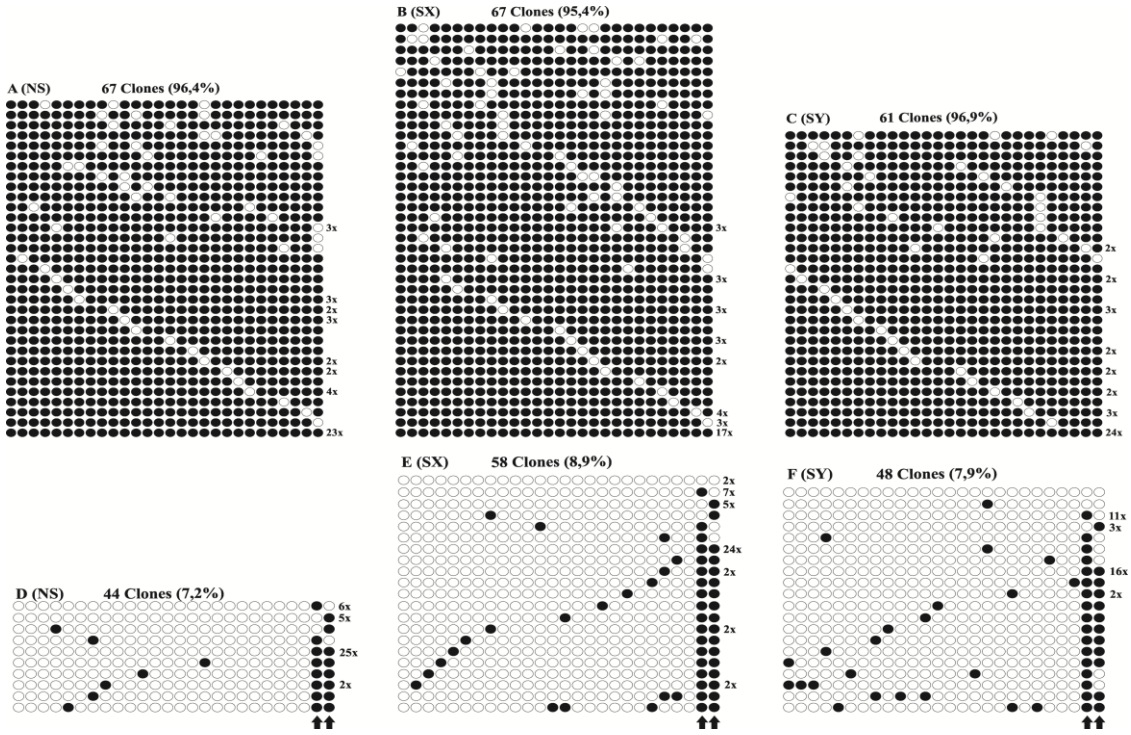

Figura 1 - Padrão de metilação da última região diferencialmente metilada do gene IGF2 (A-C) e da segunda região controladora de imprinting do gene IGF2R (D-F) em espermatozoides não sexados (A e D), sexados X (B e E) e sexados Y (C e F) de touros Nelores. As setas indicam um padrão de metilação específico nas ilhas 25 e 26 do gene IGF2R, o qual apresentou alta porcentagem de metilação. Círculos brancos e pretos representam ilhas CpGs não metiladas e metiladas, respectivamente; linhas horizontais de círculos representam um clone, e o número de clones com o mesmo padrão de metilação é indicado a direita, no fim da linha de círculos. Os dados são as médias de quatro touros, sendo três réplicas por touro para o gene IGF2 e duas réplicas para o gene IGF2R.

Tabela 1 - Porcentagem de metilação da região diferencialmente metilada do último éxon do gene IGF2 em espermatozoides não sexados (NS), sexados X (SX) e sexados Y (SY).

Touro	Grupo (% ± SEM)			P
	NS	SX	SY	
1	97,2 ± 0,6	96,4 ± 0,9	97,5 ± 0,6	0,7
2	96,1 ± 1,1	95,2 ± 0,9	96,7 ± 0,6	0,5
3	95,7 ± 0,8[a,b]	93,7 ± 1,1[a]	97,1 ± 0,7[b]	**0,03**
4	96,6 ± 0,8	96,4 ± 0,6	94,9 ± 1,5	0,4
P	0,6	0,16	0,3	

[a,b]Colunas com diferentes letras sobrescritas, diferem (P<0,05).

Tabela 2 - Porcentagem de metilação da segunda região controladora de imprinting do gene IGF2R em espermatozoides não sexados (NS), sexados X (SX) e sexados Y (SY).

Touro	Grupo (% ± SEM)			P
	NS	SX	SY	
1	6,5 ± 2,7	6,7 ± 0,7	6,1 ± 0,7[a]	0,38
2	8,0 ± 0,4	7,4 ± 0,8	9,9 ± 1,8[b]	0,47
3	7,7 ± 0,4	9,0 ± 1,0	6,4 ± 0,6[a]	0,13
4	6,7 ± 0,8	8,8 ± 1,0	9,6 ± 1,3[b]	0,14
P	0,32	0,26	**0,02**	

[a,b]Colunas com diferentes letras sobrescritas, diferem (P<0,05).

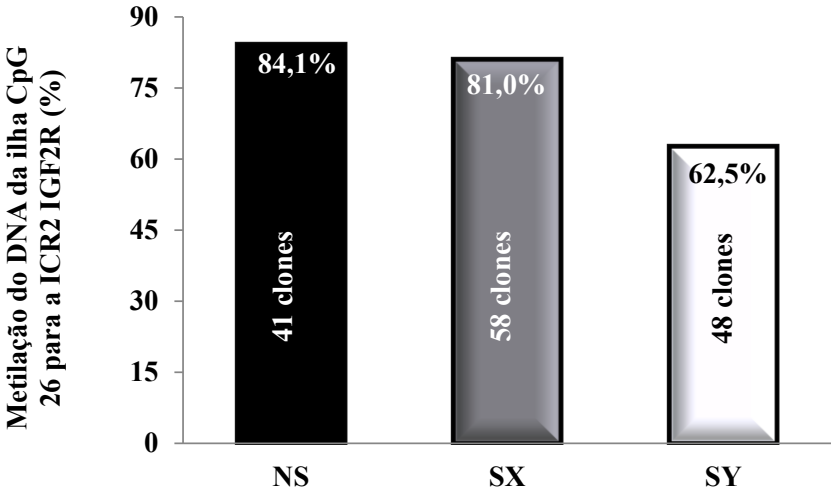

Figura 2 - Porcentagem de metilação da ilha CpG 26 da segunda região controladora de imprinting do gene IGF2R em espermatozoides bovino não sexados (NS), sexados X (SX) e sexados Y (SY). Dados provenientes das médias de quatro touros Nelore (duas réplicas por touro).

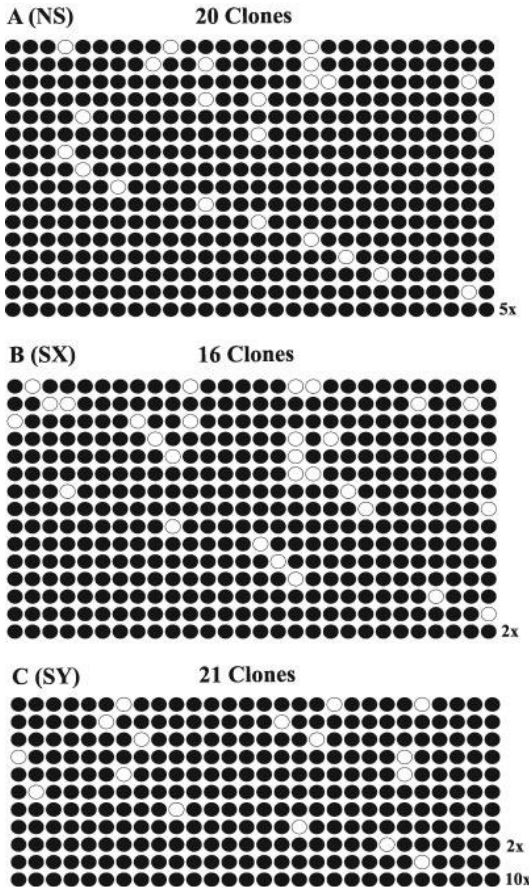

Figura 3 - Padrão de metilação da última região diferencialmente metilada do gene IGF2 em espermatozoides bovinos não sexados (A), sexados X (B) e sexados Y (C) do touro 3. Círculos brancos e pretos representam ilhas CpGs não metiladas e metiladas, respectivamente; linhas horizontais de círculos representam um clone, e o número de clones com o mesmo padrão de metilação é indicado a direita, no fim da linha de círculos. Os dados são as médias de três réplicas por grupo.

2.4 Discussão

Durante o processo de sexagem, os espermatozoides podem sofrer danos na sua estrutura, comprometendo sua viabilidade (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Desta forma, várias características espermáticas, tais como motilidade, integridade de membrana, integridade de acrossoma, integridade de cromatina, capacidade de gerar blastocisto e perfil de mRNA, tem sido avaliadas (BOE-HANSEN et al., 2005; MORTON et al., 2007; BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Entretanto, nenhum destes estudos avaliou se o processo de sexagem poderia causar alguma mudança epigenética no espermatozóide.

Nossos resultados demonstram que o processo de sexagem não afetou o padrão de metilação dos espermatozoides bovinos (Figura 1). Todas as sequencias analisadas dos genes IGF2 e IGF2R, em todos os tratamentos foram hipermetiladas e hipometilada, respectivamente. Este padrão de metilação para estas regiões específicas em espermatozoides não sexados já foram descrita por Gebert et al. (2006), Long e Cai (2007) e Gebert et al. (2009).

O processo de sexagem por citometria de fluxo expõe os espermatozoides a uma série de condições adversas que podem causar danos que poderiam comprometer o desenvolvimento embrionário e as taxas de gestação. Entretanto, em estudo prévio de nosso laboratório não foi identificado efeito da sexagem espermática, no desenvolvimento embrionário até o dia 9 de cultivo (CARVALHO et al., 2010). Portanto, foi levantada a hipótese de que a sexagem poderia causar um dano espermático que não é detectado até o D9 do desenvolvimento embrionário, mas poderia influenciar a taxa de gestação. Esta possibilidade é comprovada pela maior perda embrionária entre os dias 30 e 90 de gestação, quando é utilizado sêmen sexado em vacas e novilhas (BODMER et al., 2005). A perda embrionária entre os dias 30 e 90 de gestação também é comum em embriões clones (HILL et al., 2000; SUTEEVUN-PHERMTHAI et al., 2009), talvez devido a anormalidades na metilação do DNA durante a reprogramação nuclear (YOUNG et al., 2001; KANG et al., 2001; LONG; CAI, 2007). Desta forma, alterações nos níveis de metilação dos espermatozoides sexados poderia explicar alguns problemas como o desenvolvimento embrionário e falhas na implantação de embriões produzidos com sêmen sexado.

Desta forma, com base nos resultados obtidos de que o processo de sexagem não afeta o padrão de metilação das regiões estudadas, pode-se sugerir que os espermatozoides bovinos

são altamente resistentes a danos no DNA. É bem conhecido que os espermatozoides possuem um DNA com alta estabilidade devido ao seu genoma ser empacotado e covalentemente modificado pelas protaminas (HAMMOUND et al., 2009a) sendo que apenas uma pequena parte do DNA permanece associada a histonas (HAMMOUND et al., 2009a). Hammound et al. (2009b) sugerem que estas histonas restantes são associadas com regiões contendo genes imprinting. Embora ambos os genes avaliados neste estudo sejam imprinted, não se sabe se estas regiões são empacotadas por histonas ou protaminas, tornando o DNA menos ou mais susceptível às mudanças. Além disto, é importante considerar que neste estudo foram avaliadas duas regiões do genoma, e não pode-se afirmar que outras regiões não tenham seu padrão de metilação alterado pelo processo de sexagem. Além disso, ao longo dos últimos anos, tem ocorrido melhora no processo de sexagem, tornando-o mais eficiente e causando menos lesões aos espermatozoides (SHARPE; EVANS, 2009). Isto é comprovado por estudos que relatam uma taxa de blastocisto semelhante em espermatozoides sexados e não sexados (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; PEIPPO et al., 2010).

Surpreendentemente, foi identificado um padrão de metilação específico nas ilhas CpGs 25 e 26 do gene IGF2R. Long e Cai (2007), avaliando esta região do gene IGF2R em espermatozoides de *Bos taurus*, identificou o mesmo padrão de metilação observado neste estudo, entretanto, eles não detectarão o padrão hipermetilado encontrado nas ilhas CpGs 25 e 26. Diferenças no padrão de metilação em ilhas CpGs específicas também são relatados em outros tipos celulares e genes (KOVACHEVA et al., 2007; COLOSIMO et al., 2009). Não se sabe exatamente a causa pela qual algumas ilhas CpGs aceitam ou não a metilação, e nem se há razão biológica para esta resistência. Uma possibilidade que poderia explicar a presença desta alta metilação nas ilhas CpGs 25 e 26 do gene IGF2R, seria uma característica epigenética de *Bos indicus* comparado a *Bos taurus*. Além disto, foi encontrada diferença na porcentagem de metilação da ilha CpG 25 do gene IGF2R entre os grupos, com menor metilação do grupo SY em relação aos grupos NS e SX. Entretanto, a razão pela qual espermatozoides contendo cromossomo Y teria menor resistência a desmetilação desta ilha CpG é desconhecida.

Além disso, neste estudo, foi identificado uma ilha CpG a mais em relação ao número de ilhas CpGs relatados por outros trabalhos para esta região estudada no gene IGF2. Após o sequenciamento de DNA, foram identificadas 28 ilhas CpGs em cada clone avaliado, diferente das 27 ilhas CpGs relatadas por Gebert et al. (2006) e pelo GenBank acesso no. X53553. Em outro estudo conduzido pelo grupo, Fagundes et al. (2011) avaliando o padrão

de metilação em ovócitos bovinos maturos e imaturos, identificaram a mesma diferença no número de CpGs em relação ao estudo de Gebert et al. (2006). Isto pode ser causado pela presença de um polimorfismo em um nucleotídeo, e reforça a ideia de que esta diferença pode ser devido ao grupo genético utilizado (*Bos taurus* vs *Bos indicus*). Estes resultados indicam que a diferença no padrão de metilação das ilhas CpGs 25 e 26 do gene IGF2R e a diferença no número de ilhas CpGs do gene IGF2 pode ter algum efeito biológico no desenvolvimento do embrião e feto ou mesmo no animal adulto *Bos taurus*. Esta hipótese é baseada em várias diferenças fisiológicas relatadas entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, tais como diferenças na função ovariana e na concentração de hormônios circulantes (SARTORI; BARROS, 2011).

Quando o efeito da sexagem no padrão de metilação foi avaliado em cada touro individualmente dentro de cada tratamento, ou individual em cada touro, apenas uma pequena diferença foi encontrada entre os grupos. A diferença no padrão de metilação encontrada no touro 3 ou no grupo SY para os genes IGF2 e IGF2R, apesar de ser significativa, foi muito pequena, e pode não exercer nenhum efeito biológico. Essa variação encontrada no padrão de metilação pode ser devido a características individuais de cada touro.

2.5 Conclusão

Em conclusão, este estudo demonstrou que a sexagem por citometria de fluxo não afetou o padrão de metilação da DMR do último éxon do gene IGF2 e na segunda ICR do gene IGF2R. Entretanto, um padrão de metilação específico foi observado no gene IGF2R, assim como um polimorfirmo no gene IGF2, provavelmente devido a uma característica epigenética de animais *Bos indicus*.

Referências

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

BERMEJO-ALVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RATH, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development,** Melbourne, v. 22, p. 426-436, 2010.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reprodution,** Madison. 79, p. 594-597, 2008.

BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R.; ANTUNES, R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine tissues. **Genetics and Molecular Biology,** Ribeirão Preto, v. 25, p. 313-315, 2002.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development,** Cold Spring Harbor, v. 16, p. 6-21, 2002.

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,** New York, v. 71, p. 30-38, 2009.

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. **Bioinformatics,** Oxford, v. 21, p. 4067-4068, 2005.

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

BOE-HANSEN, G.B.; MORRIS, I.D.; ERSBOLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology,** New York, v. 63, p. 1789-1802, 2005.

CARREL, D.T.; HAMMOUD, S.S. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. **Molecular Human Reproduction,** New York, v. 16, p. 37-47, 2010.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURAO, G.B.; DODE, M.A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology,** New York, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

COLOSIMO, A.; DI ROCCO, G.; CURINI, V.; RUSSO, V.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Characterization of the methylation status of five imprinted genes in sheep gametes. **Animal Genetics,** Oxford, v. 40, p. 900-908, 2009.

CURCHOE, C.; ZHANG, S.; BIN, Y.; ZHANG, X.; YANG, L.; FENG, D.; O'NEILL, M.; TIAN, X.C. Promoter-specific expression of the imprinted IGF2 gene in cattle (Bos taurus). **Biology of Reproduction,** Madison, v. 73, p. 1275-1281, 2005.

DEJARNETTE, J.M.; LEACH, M.A.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MCCLEARY, C.R.; MORENO, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 94, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J.M.; MCCLEARY, C.R.; LEACH, M.A.; MORENO, J.F.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Effects of 2.1 and $3.5x10^6$ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 93, p. 4079-4085, 2010.

FAGUNDES, N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; CAIXETA, E.S.; MACHADO, G.M.; RODRIGUES, F.C.; MELO, E.O.; DODE, M.A.; FRANCO, M.M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in Bos taurus indicus oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction,** New York, v. 17, p. 85-91, 2011.

FEIL, R.; WALTER, J.; ALLEN, N.D.; REIK, W. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse IGF2 and H19 genes. **Development,** Cambridge, v. 120, p. 2933-2943, 1994.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GROGER, D.; REINHARDT, R.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.; LEHRACH, H.; NIEMANN, H. The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA**. Genomics,** San Diego, v. 88, p. 222-229, 2006.

GEBERT, C.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; GROGER, D.; THIEL, J.; REINHARDT, R.; LEHRACH, H.; HAJKOVA, P.; LUCAS-HAHN, A.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. **Genomics,** San Diego, v. 94, p. 63-69, 2009.

GOSALVEZ, J.; RAMIREZ, M.A.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; CRESPO, F.; EVANS, K.M.; KJELLAND, M.E.; MORENO, J.F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. **Theriogenology,** New Youk,75(2):197-205, 2011.

HAMMOUD, S.; LIU, L.; CARRELL, D.T. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. **Andrologia,** Berlin, v. 41, p. 88-94, 2009a.

HAMMOUD, S.S.; NIX, D.A.; ZHANG, H.; PURWAR, J.; CARRELL, D.T.; CAIRNS, B.R. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature,** London, v. 460, p. 473-478, 2009b.

HEALY, A.A.; HOUSE, J.K.; THOMSON, P.C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 96, p. 1905-1914, 2013.

HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics,** New York, v. 33, p. 245-254, 2003.

KANG, Y.K.; KOO, D.B.; PARK, J.S.; CHOI, Y.H.; CHUNG, A.S.; LEE, K.K.; HAN, Y.M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature Genetics,** New York, v. 28, p. 173-177, 2001.

KOVACHEVA, V.P.; MELLOTT, T.J.; DAVISON, J.M.; WAGNER, N.; LOPEZ-COVIELLA, I.; SCHNITZLER, A.C.; BLUSZTAJN, J.K. Gestational choline deficiency

causes global and IGF2 gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 282, p. 31777-31788, 2007.

LALANCETTE, C.; THIBAULT, C.; BACHAND, I.; CARON, N.; BISSONNETTE, N. Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 78, p. 618-635, 2008.

LEBEDEV, I. N.; SAZHENOVA, E. A. Epimutations of Imprinted Genes in the Human Genome: Classification, Causes, Association with Hereditary Pathology. **Genetika,** Moszka, v.44, n. 10, p. 1176–1190, 2008.

LONG, J.E.; CAI, X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene,** Amsterdam, v. 388, p. 125-134, 2007.

LUCIFERO, D.; MANN, M.R.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human Molecular Genetics,** Oxford, v. 13, p. 839-849, 2004.

MELLADO, M.; CORONEL, F.; ESTRADA, A.; RIOS, F.G. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. **Tropical Animal Health Production,** Edinburgh, v. 42, p. 1493-1496, 2010.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.; 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,** New York, v. 74, p. 931-940, 2007.

NEWELL-PRICE, J.; CLARK, A.J.; KING, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends in Endocrinology and Metabolism,** New York, v. 11, p. 142-148, 2000.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RATY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMAKI, H.; SAIRANEN, A.; MAKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v. 111, p. 80-92, 2009.

PERECIN, F.; MÉO, S.C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C.R.; MERIGHE, G.K.F.; MEIRELLES, F.V.; GARCIA, J.M. Imprinted gene expression in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetic Molecular Research,** Ribeirão Preto, v. 8, p. 76-85, 2009.

POPLINSKI, A.; TUTTELMANN, F.; KANBER, D.; HORSTHEMKE, B.; GROMOLL, J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. **International Journal of Andrology,** Copenhagen, v 33, p. 642-649, 2010.

RICHARDS, E.J.; ELGIN, S.C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. **Cell,** Cambridge, v.108, p.489-500, 2002.

SALES, J.N.; NEVES, K.A.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SA FILHO, M.F.; BARUSELLI. P.S. Timing of

insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology,** New York, v. 76, p. 427-435, 2011.

SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v. 124, p. 244-250, 2011.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; 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,** Belo Horizonte, v. 1, p. 86-90, 2004.

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

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

SUTEEVUN-PHERMTHAI, T.; CURCHOE, C.L.; EVANS, A.C.; BOLAND, E.; RIZOS, D.; FAIR, T.; DUFFY, P.; SUNG, L.Y.; DU, F.; CHAUBAL, S.; XU, J.; WECHAYANT, T.; YANG, X.; LONERGAN, P.; PARNPAI, R.; TIAN, X.C. Allelic switching of the imprinted IGF2R gene in cloned bovine fetuses and calves. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v. 116, p. 19-27, 2009.

TAVALAEE, M.; RAZAVI, S.; NASR-ESFAHANI, M.H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertility and Sterility,** New York, v. 91, p. 1119-1126, 2009.

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; EBSWORTH, M.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Animal Reproduction Science,** Amrsterdam, 118(1):7-12, 2010a.

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science,** Amsterdam, v. 118, p. 171-175, 2010b.

YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics,** New York, v. 27, p. 153-154, 2001.

ZWART, R.; SLEUTELS, F.; WUTZ, A.; SCHINKEL, A.H.; BARLOW, D.P. Bidirectional action of the Igf2r imprint control element on upstream and downstream imprinted genes. **Genes and Development,** Cold Spring Harbor, v. 15, p. 2361-2366, 2001.

3 DIFERENÇAS NANOMÉTRICAS NA FORMA E TAMANHO DA CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS CONTENDO CROMOSSOMO X OU Y AVALIADOS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Publicado em:

CARVALHO, J.O.; SILVA, L.P.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N. Nanoscale Differences in the Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed by Atomic Force Microscopy. **Plos One,** San Francisco, v.8, p. e59387, 2013.

Resumo

A microscopia de força atômica (MFA) fornece detalhes nanométricos e em três dimensões de estruturas naturais, os quais não podem ser avaliados por outras técnicas, além de manter as estruturas próximas ao seu estado fisiológico. Portanto, a MFA é uma ferramenta que pode ser utilizada para detectar possíveis diferenças no tamanho e na forma dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y. Esta possibilidade é de grande importância, especialmente para o desenvolvimento de métodos alternativos para a sexagem espermática. O objetivo deste estudo foi comparar o tamanho e a forma da cabeça de espermatozoide contendo cromossomo X ou Y, utilizando MFA. Foram utilizadas amostras de sêmen congeladas de quatro touros Nelore. Para cada touro, do mesmo ejaculado foi produzido sêmen não sexado (NS), sexado X (SX) e sexado Y (SY). Para avaliação em MFA, foram analisados os grupos NS, SX, SY e outro grupo formado pelo pool de SX e SY (SXY). A análise quantitativa das 400 imagens de células adquiridas em MFA por grupo foi feita em software que mensura aspectos morfológicos estruturais de medidas uni, bi e tri dimensionais, totalizando 11 variáveis, como: raio médio, perímetro, área de superfície, diâmetro máximo e volume da cabeça dos espermatozoides. Posteriormente, foi formado um quarto conjunto de medidas com 12 variáveis obtidas através de equações matemáticas utilizando medidas uni e bi dimensionais, identificadas como descritores de forma. Para comparação entre grupos, foi feita análise de variância ($P<0,05$). Posteriormente, realizou-se avaliação simultânea das características pela análise discriminante, que permite avaliar a qual grupo pertence os indivíduos, aos quais foram feitas diversas e idênticas mensurações. Não foram encontradas diferenças nas variáveis entre grupos. Entretanto, usando simultaneamente diversos parâmetros por meio de

análise discriminante, na tentativa de diferenciar os grupos, o modelo mais discriminante atingiu 100% de precisão na separação entre NS, SX, SY e SXY. Nesse modelo, as características de maior relevância para NS, SX, SY e SXY foram os descritores de forma, como rugosidade de membrana (1,39±0,01; 1,37±0,02; 1,37±0,02 e 1,37±0,02), taxa de circularidade (0,72±0,01; 0,73±0,01; 0,73±0,01 e 0,73±0,01), grau de circularidade (2,05± 0,01; 2,02±0,03; 2,01±0,02 e 2,03±0,08) e elongação (17,5±0,02; 17,2±0,07; 17,2±0,21 e 17,3±0,3). Apesar da pequena diferença numérica, a separação distinta entre os grupos só foi possível devido à alta precisão do equipamento associada à análise discriminante. Este estudo identificou claramente, que o processo de sexagem afeta a forma dos espermatozoides e, que espermatozoides contendo cromossomo X ou Y diferem quanto à morfometria e a superfície de membrana.

Palavras-chave:Estrutural, Bovino, Nanotecnologia

Abstract

The atomic force microscopy (AFM) provides three-dimensional data images in nanometric scale from surface of natural structures, kept closely to its physiological state. Therefore, is a tool to accurately evaluate the morphometry of sperm head. To date, the effects of sexing on the dimensions of the sperm head in such level of details have never been reported in the literature. The aim of this study was evaluate whether sexing by flow cytometry changes the dimensions and surface of the sperm head, and whether these measurements differ between cells that bearing the X or Y chromosome. Frozen semen from four Nellore bulls was used. For all the bulls the same ejaculate was used to produce non-sexed semen (NS), sexed X (SX) and sexed Y (SY). For AFM were analyses the groups NS, SX, SY and a fourth group formed by pooling SX and SY samples (SXY). Quantitative analysis of the 400 images for groups in MFA was performed using software that considered one, two and three dimensional morphological and structural measurements. The analysis took into account a total of 11 variables, such as mean radius, perimeter, surface area, maximum diameter and volume of spermatozoa heads. Moreover, a fourth set with 12 variables was formed using mathematical formulas and uni and bi dimensional measurements, which were identified as shape descriptors. For comparisons among groups, analysis of variance was performed ($P<0.05$). Then, simultaneous evaluation of features by discriminator analysis was conducted, to determine to which group belong each individual cell, which had

been submitted to the identical evaluations and measurements. No differences were observed between groups for all variables. However, using different parameters simultaneously in discriminator analysis, in an attempt to differentiate groups, the greatest discriminator model had 100% accuracy in separating NS, SX, SY and SXY. In that model, the features with greatest relevance to NS, SX, SY and SXY were shape descriptors, such as roughness of membrane (1.39±0.01 1.37±0.02, 1.37±0.02 and 1.37±0.02), circularity ratio (0.72±0.01, 0.73±0.01, 0.73±0.01 and 0.73±0.01) degree of roundness (2.05±0.01, 2.02±0.03, 2.01±0.02 and 2.03±0.08), elongation (17.5±0.02; 17.2±0.07, 17.2±0.21 and 17.03±0.3). The distinct separation of the groups was possible due to high precision of the equipment associated with the discriminator analysis. This study identified that the process of sexing affects the shape of sperm. Moreover, it has demonstrated that sperm containing X or Y chromosome showed different changes in morphometry and surface membrane.

Keywords: Structural, Bovine, Nanotechnology

3.1 Introdução

Desde a descoberta feita por Painter (1923) de que os espermatozoides contem um cromossomo X ou Y, tem sido de grande interesse o desenvolvimento de tecnologias que permitam a separação dos espermatozoides que carregam o cromossomo X ou o Y, já que a sexagem espermática tem um grande impacto econômico na indústria animal. Embora vários métodos tenham sido propostos para a sexagem espermática, a citometria de fluxo, é o único método utilizado comercialmente . Este procedimento é baseado na diferença do conteúdo de DNA entre espermatozoides contendo cromossomo X ou Y, sendo que esta diferença em bovinos é de aproximadamente 4% (GARNER et al., 1993). Entretanto, as menores taxas de produção de embriões em programas de transferência de embriões (TE) ou taxa de gestação na inseminação artificial (IA) (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013) observadas quando espermatozoides sexados são utilizados, têm motivado pesquisas para o desenvolvimento de metodologias alternativas. O desenvolvimento de uma nova metodologia de separação espermática poderia eliminar os danos causados nos espermatozoides durante o processo de sexagem por citometria de fluxo.

Entretanto, para o desenvolvimento de uma nova metodologia de sexagem espermática, é fundamental a identificação de uma ou mais característica, além da diferença de DNA já conhecida, que torne possível a identificação dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y. Neste sentido, alguns estudos tem mostrado diferença no volume da cabeça dos espermatozoides bovino contendo o cromossomo X ou Y (VAN MUNSTER et al., 1999). Da mesma forma, espermatozoides humanos contendo cromossomo X, são mais largos e longos do que espermatozoides contendo o cromossomo Y (CUI; MATTHEWS 1993; CUI, 1997). Estes resultados indicam uma potencial diferença no tamanho e na forma da cabeça de espermatozoides X e Y, o que poderia ser utilizado para o desenvolvimento de uma nova tecnologia de sexagem espermática. Entretanto, em um estudo realizado por Zavaczkiet et al. (2006), avaliando mais de 2000 espermatozoides humanos X ou Y, não identificaram diferenças entre os grupos, gerando dúvidas se realmente os espermatozoides contendo cromossomo X ou Y diferem em alguma característica morfométrica.

Nestes estudos que avaliaram uma possível diferença na cabeça de espermatozoides X ou Y, os mesmos foram fotografados utilizando microscopia de luz, com as avaliações de medidas realizadas manualmente (CUI; MATTHEWS, 1993; CUI, 1997; VAN MUNSTER et al., 1999). Desta forma, possíveis erros e limitações das técnicas, poderiam ser responsáveis pelos resultados inconstantes. De fato, pequenos detalhes da estrutura da cabeça dos espermatozoides não poderiam ser identificados por esta avaliação manual, oferecendo limitada resolução, além de grande manipulação da amostra durante o seu preparo (IERARDI et al., 2008). Portanto, ainda não há dados precisos sobre as possíveis diferenças na forma e tamanho da cabeça de espermatozoides X ou Y. Medidas da cabeça dos espermatozoides, utilizando uma técnica de alta resolução, poderiam fornecer novas informações sobre esta possível diferença. Neste sentido, a microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica promissora para estudos de espermatozoides de diferentes espécies (ELLIS et al., 2002; SAEKI et al., 2005). A MFA é um microscópio de varredura de alta precisão, muito utilizado para mapear a superfície topográfica de diferentes tipos celulares (BINNING; QUATE; GERBER, 1986). A MFA fornece detalhes tri dimensionais da estrutura celular, podendo identificar alterações fisiológicas e patológicas das células. Além disto, a MFA fornece imagens da superfície celular, com resolução nanométrica, quase em tempo real (BERDYYEVA; WOODWORTH; SOKOLOV, 2005). Esta técnica já tem sido utilizada para determinar características da estrutura de espermatozoide bovino, humano e de coelhos, com avaliação morfológica de espermatozoides com ou sem acrossoma, assim como mudanças

estruturais durante o processo de maturação e capacitação espermática (JOSHI et al., 2001; ELLIS et al., 2002; MAI et al., 2002; SAEKI et al., 2005. JONES et al., 2007; IERARDI et al., 2008). Entretanto, nenhum estudo utilizou a MFA para avaliar diferenças na forma e tamanho de espermatozoides que contem os cromossomas X ou Y.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a potencial diferença na forma e tamanho dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y utilizando a MFA. Foi demonstrado que quando é realizada análise simultânea de todas as características avaliadas, foi possível distinguir claramente os grupos de espermatozoides X ou Y. Este conhecimento pode melhorar o entendimento da biologia dos espermatozoides, podendo ser utilizado no desenvolvimento de um novo método de sexagem espermática.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Separação dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y

Para separação dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y, foi utilizado o processo de sexagem por citometria de fluxo, utilizando sêmen de quatro touros da raça nelore. Todo o processo de sexagem e congelação foram realizados conforme descrito no capítulo 1 (Item 2.2.1).

3.2.2 Preparação dos espermatozoides para avaliação em microscopia de força atômica

Uma palheta de cada grupo/touro NS, SX e SY foi descongelada, e um quarto grupo foi formado pelo pool de espermatozoides SX e SY (SXY). Após a descongelação, foi retirada uma amostra de cada grupo para avaliação da integridade de acrossoma, utilizando probe fluorescente isothiocianate-conjugado com *peanut agglutinin* (FITC-PNA) e iodeto de propídeo (PI), conforme descrito por Klinc e Rath (2007). Uma amostra de sêmen (10 µL) foi diluída em uma solução de corante (30 mL) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL de solução de corante com sêmen foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. A solução de corante era composta por 10 µL de solução formol salina, 960 µL de citrato de sódio 3%, 10 µL de iodeto de propídeo a 0,75 mM e 20 µl de FITC-PNA a 1mg/mL em PBS (Anexo A). Para cada amostra foram examinadas 200 células espermáticas em

microscópio de contraste de fase e epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão). Os espermatozoides foram classificados em quatro categorias, sendo: morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma) (Figura 1).

O restante da amostra foi centrifugado por 5 min a 200 g para separação do diluente. O sobrenadante foi descartado e o pellet fixado por 5 min em solução de formol salina 1,6%, sendo posteriormente centrifugado por 5 min a 200 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes em 1 mL de águas destilada por 5 min a 200 g. O pellet foi resuspendido em 30-200 µL de água destilada. Finalmente, 2 µL da alíquota foi colocada sobre uma lamínula e seca em ar. Esta lamínula contendo a amostra foi utilizada para aquisição das imagens em MFA.

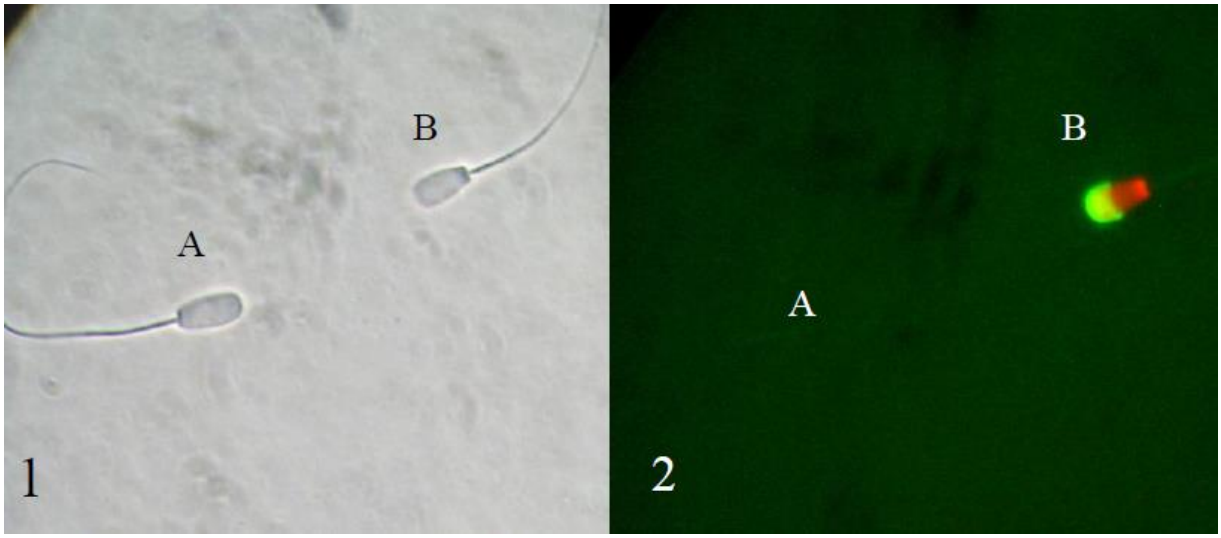

Figura 1 - Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura do microscópio com objetiva de 40x. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A) visualizado no contraste de fase (1) não se apresenta corado com a conjugação de isoticianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut aglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B) visualizado no contraste de fase (1) apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2).

3.2.3 Análise das amostras em microscópio de força atômica

Foi realizada análise em MFA, usando SPM-9600 (Shimadzu, Japan) como descrito por Bonatto et al. (2009). As imagens foram adquiridas em modo contato usando 200 µm de

comprimento com cantlevers em forma de V (constante de ~0.15 N/m, frequência de ressonância de 24 kHz) com ponteira piramidal integrada (raio de curvatura <20 nm). A varredura foi feita com extensão de 125 µm na direção XY e 7 µm na direção de Z. Todas as imagens foram adquiridas em 512 x 512 pixels e taxa de varredura de 1Hz. As imagens foram processadas usando SPM-9600 off-line software, sendo previamente feito um ajuste automático das superfícies. Foram capturadas imagens de 100 células de cada animal/grupo, sendo posteriormente segmentadas manualmente usando um zoom digital a partir da imagem original. Foram avaliadas 23 características, incluindo descritores de forma e medidas uni, bi e tri dimensionais. Os descritores de forma foram formados usando fórmulas matemáticas com valores uni e bi dimensionais.

3.2.4 Fórmulas matemáticas utilizadas para gerar os descritores de forma

Fator de forma: (4*pi*área excluindo buracos)/(perímetro*perímetro).

Circularidade: (4*área incluindo buracos)/pi*(diâmetro máximo*diâmetro máximo).

Taxa de aspecto: diâmetro máximo/largura.

Diâmetro efetivo: (área incluindo buracos/pi)*2.

Distorção: este descritor de forma foi feito de acordo com o manual fornecido pelo fabricante.

Grau de circularidade: pi*diâmetro máximo/4*área excluindo buracos.

Taxa de circularidade: (4*pi*área incluindo buracos)/perímetro*perímetro.

Grau de fineza: diâmetro máximo/largura.

Taxa de compactação: (√(4/pi)*área incluindo buracos)/diâmetro máximo.

Elongação: (perímetro*perímetro)/área incluindo buracos.

Rugosidade: (perímetro*perímetro)/(4*pi*área excluindo buracos).

Circularidade em grau: (2*√área incluindo buracos)/perímetro

3.2.5 Análise estatística

Um total de 23 características foram analisadas utilizando contraste de média do modelo linear generalizado (PROC GLIMMIX; SAS 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). As médias das características foram comparadas utilizando teste-F, com nível de significância de α = 0,05. Também foi realizada análise coletiva de todas as características agrupadas, utilizando um modelo de análise discriminante (tolerância de 10^{-20}). Os dados são apresentados em média ± erro padrão (EP).

3.3 Resultados

Considerando que a presença do acrossoma pode afetar o volume da cabeça do espermatozoide, para evitar efeito da presença ou não do acrossoma foi avaliada a porcentagem de células com acrossoma em todas as amostras. Não foi encontrada diferença na porcentagem de células com acrossoma intacto entre os grupos NS, SXY, SX e SY (Figura 2).

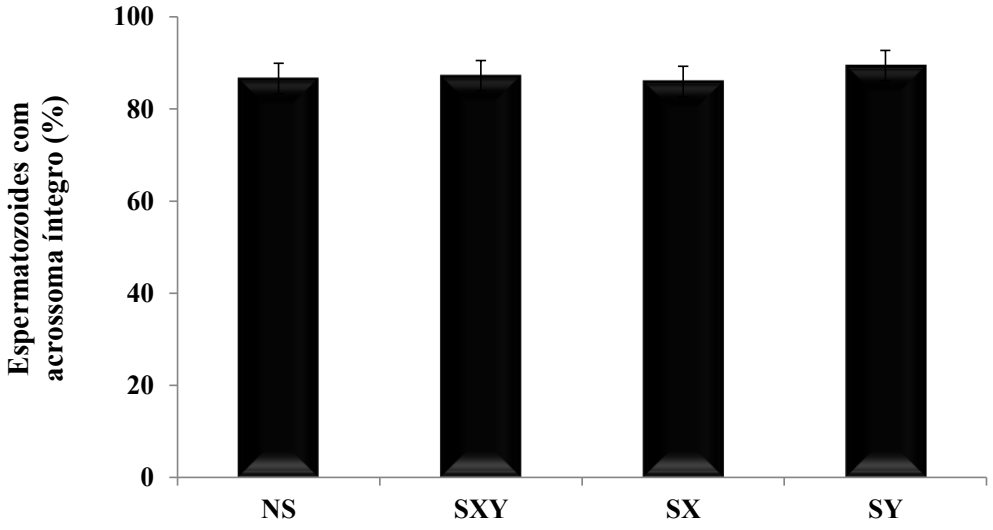

Figura 2 - Porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro avaliados com a conjugação de isoticianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut aglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP). Não houve diferença entre os grupos (P>0,05).

Na avaliação da MFA, foram feitas análise de 23 medidas uni, bi e tri dimensionais e os descritores de forma. Os resultados são apresentados na Tabela 1, 2 e 3. A partir destas medidas, foi possível determinar as dimensões da cabeça de um espermatozoide bovino contendo cromossomo X (Figura 3 A-C) e Y em *Bos indicus*. Quando os grupos SX e SY foram comparados, não foi encontrada diferença nas características individuais (Tabela 1, 2 e 3). Entretanto, o grupo NS apresentou maior altura mínima, elongação e rugosidade de membrana e menor fator de forma, taxa e grau de circularidade do que o grupo SXY (Tabela 1 e 3).

Além disso, para tentar distinguir a qual grupo pertence cada célula individualmente, foi realizada análise simultânea de todas as medidas, pelo modelo estatístico de análise discriminante. Estes resultados são apresentados na Figura 4, com os grupos sendo representados por elipses de diferentes cores, sendo possível diferenciar cada grupo com 100% de acurácia. A análise discriminante utilizando os descritores de forma demonstrou claramente que é possível separar os grupos SX e SY (Figura 4 B). Já para a separação dos grupos NS e SXY, a melhor distinção foi encontrada quando se utiliza os valores de medidas uni, bi e tri dimensionais na análise discriminante (Figura 4 A).

Tabela 1 - Valores (± EP) de medidas uni dimensionais avaliadas por microscopia de força atômica de espermatozoides não sexados (NS), pool de sexados X e Y (SXY) sexados X (SX) e sexados Y (SY).

Grupo	Medidas de estruturas uni dimensionais						
	Raio médio (µm)	**Variância de raio médio (µm)**	**Altura máxima (µm)**	**Altura mínima (µm)**	**Altura média (µm)**	**Diâmetro máximo (µm)**	**Largura (µm)**
NS	3,99±0,21	1,02±0,05	0,47±0,03	0,15±0,02[a]	0,29±0,02	11,97±0,59	7,14±0,38
SXY	3,99±0,08	1,01±0,06	0,45±0,01	0,13±0,01[b]	0,28±0,01	10,94±0,36	7,46±0,31
SX	4,09±0,32	1,02±0,06	0,46±0,02	0,14±0,01	0,29±0,02	11,19±0,89	7,42±0,98
SY	4,08±0,22	1,02±0,07	0,48±0,07	0,14±0,02	0,30±0,04	11,15±0,66	7,70±0,17

[a,b]Dentro de cada coluna, difere entre NS e SXY (P<0,05).

Valores obtidos pela média de 400 espermatozoides por grupo.

Tabela 2 - Valores (± EP) de medidas bi e tri dimensionais avaliadas por microscopia de força atômica de espermatozoides não sexados (NS), pool de sexados X e Y (SXY) sexados X (SX) e sexados Y (SY).

Grupo	Bi dimensionais			Tri dimensionais
	Perímetro (µm)	Área incluindo orifício (µm^2)	Área de superfície (µm^2)	Volume (µm^3)
NS	28,4±1,5	46,4±5,0	46,9±4,9	13,67±1,44
SXY	28,3±0,6	46,5±5,4	47,1±1,6	13,22±0,65
SX	29,9±2,2	49,0±7,7	49,6±7,7	14,3±1,7
SY	28,9±1,6	48,9±5,3	49,4±5,3	14,9±2,7

Não houve diferença entre grupos (P>0,05).

Valores obtidos pela media de 400 espermatozoides por grupo.

Tabela 3 - Valores (± EP) de medidas dos descritores de forma de espermatozoides não sexados (NS), pool de sexados X e Y (SXY) sexados X (SX) e sexados Y (SY).

Grupos	Descritores de forma											
	Fator de forma	Circularidade	Taxa de aspecto	Diâmetro efetivo	distorção	Grau de circularidade	Taxa de circularidade	Grau de fineza	Taxa de compactação	Elongação	Rugosidade	Circulariade em grau
NS	0,71±0,01[a]	0,49±0,01	1,65±0,03	7,67±0,41	0,71±0,02	2,05±0,01	0,72±0,01[a]	1,65±0,03	0,70±0,01	17,5±0,02[a]	1,39±0,01[a]	0,85±0,01[a]
SXY	0,72±0,01[b]	0,49±0,02	1,59±0,06	7,69±0,13	0,73±0,01	2,03±0,08	0,73±0,01[b]	1,59±0,06	0,70±0,01	17,3±0,30[b]	1,37±0,02[b]	0,86±0,01[b]
SX	0,73±0,01	0,50±0,01	1,64±0,09	7,88±0,60	0,73±0,04	2,02±0,03	0,73±0,01	1,63±0,09	0,70±0,01	17,2±0,07	1,37±0,01	0,85±0,01
SY	0,73±0,01	0,50±0,01	1,56±0,06	7,87±0,42	0,73±0,02	2,01±0,04	0,73±0,01	1,56±0,06	0,70±0,01	17,2±0,21	1,37±0,01	0,85±0,01

[a,b]Dentro de cada coluna, difere entre NS e SXY (P<0,05).

Valores obtidos pela média de 400 espermatozoides por grupo.

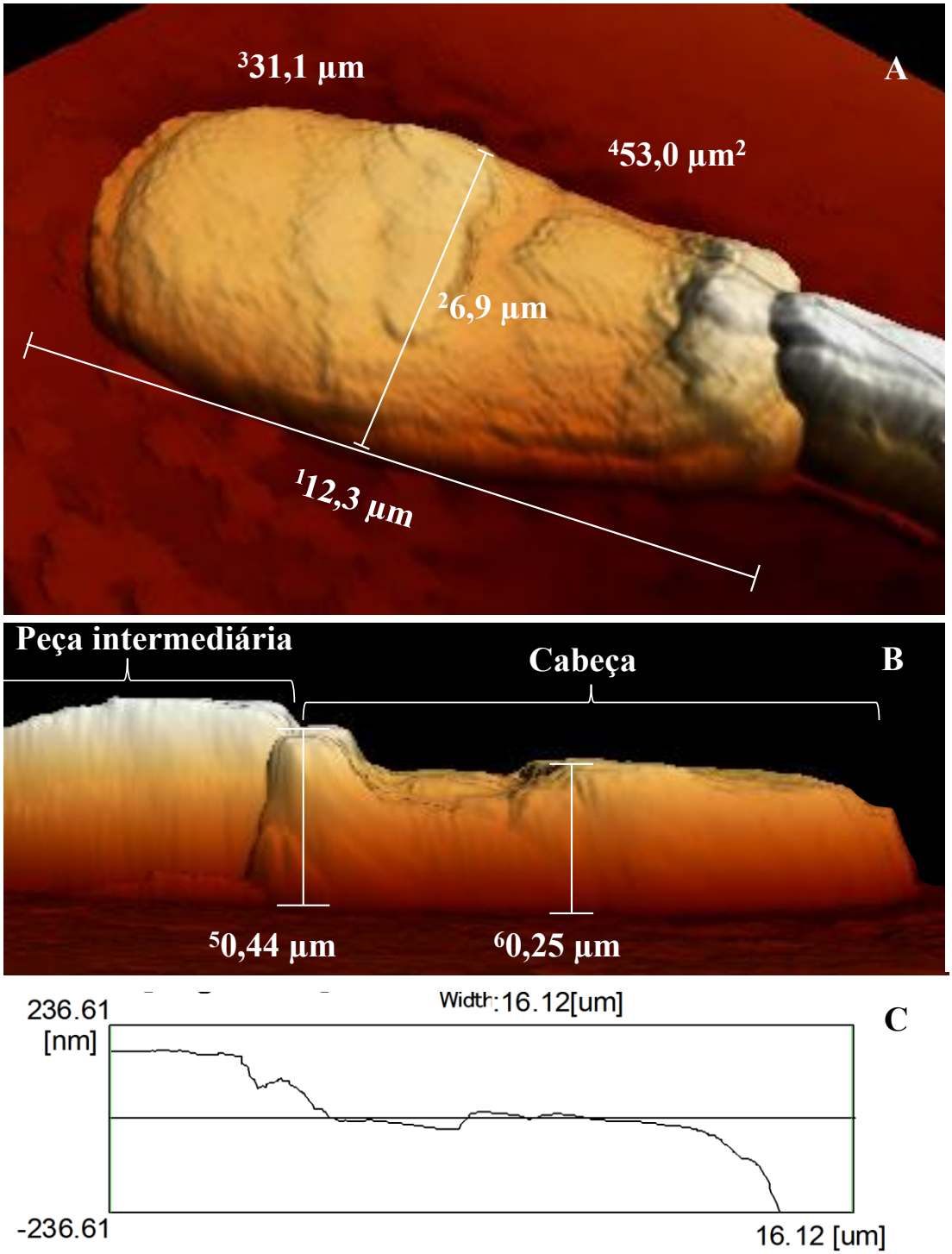

Figura 3 - Imagem tridimensional (A e B) e perfil de linha (C) feita em microscópio de força atômica (MFA), demonstrando diferentes dimensões de um espermatozoide que contem o cromossomo X. 1. Diâmetro máximo; 2. Largura; 3. Perímetro; 4. Área de superfície; 5. Altura máxima; 6. Altura média.

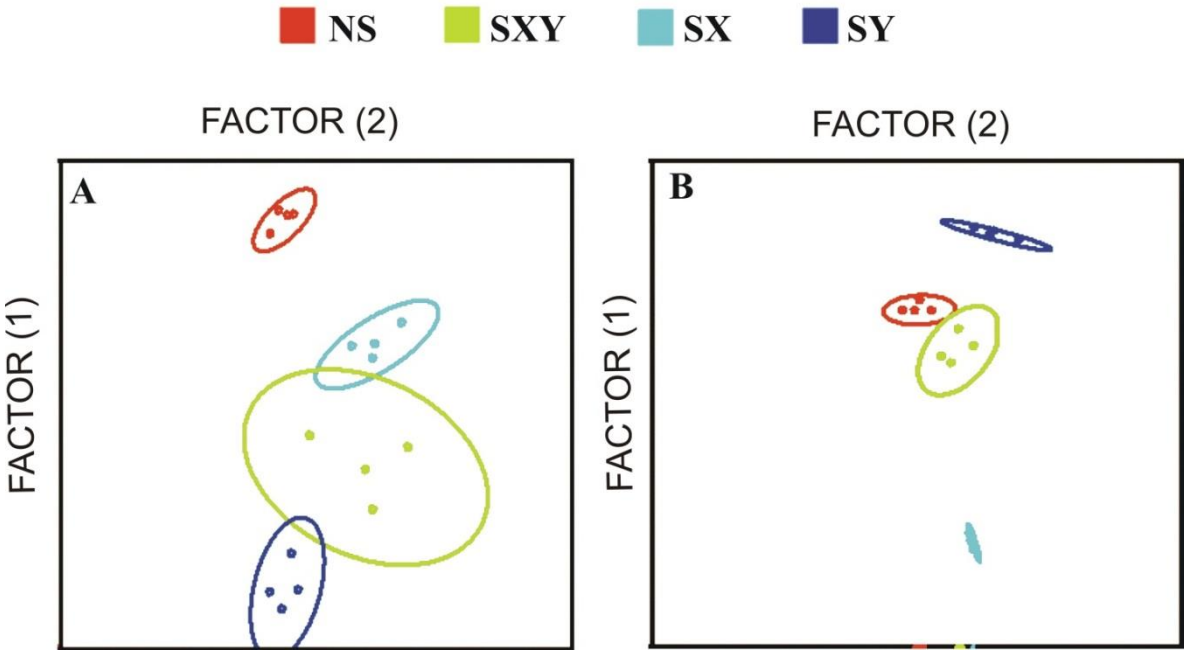

Figura 4 - Análise discriminante dos espermatozoides não sexados (NS), pool de sexados X e Y (SXY), sexados X (SX) e sexados Y (SY) usando medidas uni, bi e tridimensionais (A) e descritores de forma (B). Cada ponto representa um touro em cada grupo. A análise realizada usando 100 espermatozoides por touro, com 400 espermatozoides por grupo.

3.4 Discussão

A possibilidade da diferença no tamanho e forma de espermatozoides contendo cromossomo X ou Y é de grande interesse na indústria animal, especialmente para o desenvolvimento de um método alternativo para sexagem espermática. Alguns estudos relacionados a possíveis diferenças entre espermatozoides X e Y têm apresentado resultados controversos (CUI; MATTEWS, 1993; CUI, 1997; VAN MUNSTER et al., 1999; ZAVACZKI et al., 2006).

Entretanto, nestes estudos, além dos espermatozoides passarem por grande manipulação durante a preparação da amostra, os métodos utilizados para avaliar as dimensões da cabeça dos espermatozoides apresentavam resolução limitada, e pequenos detalhes da célula não podem não ter sido detectados. A limitação destes estudos pode ser superada se uma técnica que obtenha imagens em escalas nanométricas for utilizada. Desta forma, a MFA tem sido uma nova possibilidade no estudo da forma dos espermatozoides, obtendo imagens em três dimensões da superfície espermática. No presente estudo a MFA foi pela primeira vez

utilizada para avaliação de possíveis diferenças entre espermatozoides contendo cromossomo X e Y.

Estudos utilizando imagens feitas por MFA identificaram diferenças entre espermatozoides com acrossoma intacto ou reagido (MAI, et al., 2002; SAEKI et al., 2005). A área de espermatozoides com acrossoma reagido foi aproximadamente 40% menor que espermatozoides com acrossoma intacto (SAEKI et al., 2005). Como a ausência de acrossoma pode alterar características estruturais da cabeça do espermatozoide, foi a avaliado a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto em todas as amostras. No presente estudo, não foi encontrada nenhuma diferença na porcentagem de células com acrossoma intacto entre os grupos. Desta forma, as diferenças encontradas entre os grupos não pode estar relacionada à presença ou ausência de acrossoma.

Em relação às medidas espermáticas das 23 características avaliadas individualmente, não foi observada diferença no tamanho ou forma dos espermatozoides entre os grupos SX e SY. Resultado semelhante foi encontrado por Zavaczki et al. (2006) usando fotografia em contraste fase interdiferencial (DIC). Entretanto, outros estudos identificaram diferenças no comprimento, perímetro, área e volume entre espermatozoides contendo cromossomo X e Y de bovino (VAN MUNSTER et al., 1999) e humano (CUI; MATTEWS, 1993; CUI, 1997). Nestes estudos os autores propõe que a diferença é devido à variação no conteúdo total de DNA entre espermatozoides contendo cromossomo X e Y. Em nosso estudo, esta diferença de DNA não foi suficiente para gerar variação no volume da célula. Isto esta de acordo com Zavaczki et al. (2006), os quais não identificaram nenhuma diferença nas dimensões da cabeça de espermatozoides humano com dissomias de cromossomos com XX, XY ou YY.

Nos estudos anteriores, as dimensões espermáticas foram baseadas em medidas manuais feitas a partir de imagens fotográficas (CUI; MATTEWS, 1993; CUI, 1997; VAN MUNSTER et al., 1999). Além disso, era realizada grande manipulação das amostras, incluindo o uso de sonicação, o qual poderia causar mudanças na forma da cabeça do espermatozoide. Esta hipótese é baseada no fato de que quando os espermatozoides são sonicados para remoção da cauda, pode ocorrer uma quebra da cauda, em relação à cabeça, em diferentes pontos. Como a cauda contribui para o volume total da cabeça do espermatozoide, isto poderia ser responsável pela diferença encontrada no volume da cabeça espermática.

Outra possibilidade em relação às diferenças observadas entre este estudo e estudos prévios pode ser devido a diferenças nas técnicas utilizadas. Avaliação de espermatozoides utilizando MFA fornece imagens topográficas, as quais podem ser visualizadas em 3D com identificação de detalhes manométricos (IERARDI et al., 2008). Além disso, as amostras de espermatozoides para avaliação em MFA são preparadas rapidamente, quase sobre condições fisiológicas (KUMAR et al., 2005). Embora as imagens de MFA possam ser realizadas em células vivas, para este estudo não era possível fazer a captação das imagens sem prévia fixação, pois o tempo de captação de cada imagem era de aproximadamente 10 min. Como o espermatozoide é uma célula dinâmica, ao longo do tempo de captação das imagens, os espermatozoides poderiam passar por alterações de sua estrutura e membrana plasmática, causados pelos processos de capacitação e reação acrossômica. Estas alterações poderiam modificar a forma da cabeça dos espermatozoides, alterando o resultado, o que torna inviável o uso de células vivas para este tipo de estudo inicial. Portanto, para evitar estas alterações, foi realizada fixação prévia dos espermatozoides. O procedimento de fixação utilizado foi capaz de manter todas as células no mesmo estágio ao longo do tempo necessário para aquisição das imagens. Além disto, como todos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de preparação das amostras, a diferença encontrada entre os grupos não pode ser devido a artefatos ou distorção causados durante a preparação das amostras.

Na tentativa de diferenciar espermatozoides que contem cromossomo X ou Y, foi realizada avaliação simultânea de todas as variáveis mensuradas, através de uma análise estatística discriminante. A análise discriminante permite predizer a qual grupo pertence uma célula, baseada em uma combinação linear das variáveis. Esta análise é possível quando um conjunto de medidas idênticas é feito em ambos os grupos. O resultado final é um modelo que permite predizer a qual grupo pertence cada célula, mesmo que estas células não apresentem nenhuma diferença na análise individual.

Usando todas as medidas uni, bi e tri dimensionais, foi possível distinguir todos os grupos com 100% de exatidão. Quando foram utilizados os valores de descritores de forma na análise discriminante, foi identificada uma clara separação entre as amostras SX e SY. Estes parâmetros são gerados através de fórmulas matemáticas utilizando as medidas uni e bidimensionais. Nossos resultados demonstram que os descritores de forma têm um importante papel na diferenciação dos espermatozoides contendo cromossomo X e Y, podendo ser considerados candidatos a serem utilizados como possível característica que diferenciam espermatozoides X e Y. Este conhecimento de diferenças nanométricas,

associadas com emergentes nanotecnologias, através do uso de nanoparticulas ou nanomoléculas, poderia ser utilizado no desenvolvimento de um novo método de sexagem.

Além disto, a diferença encontrada nos descritores de forma poderia ser responsável por diferença no padrão de movimento entre espermatozoides X e Y (PENFOLD et al., 1998). Embora o movimento espermático seja iniciado na peça intermediária, uma diferença na forma da cabeça poderia influenciar na hidrodinâmica do espermatozoide, afetando o seu movimento.

Como a citometria de fluxo é o único método de sexagem espermática eficiente, essa foi à técnica utilizada para separar os espermatozoides X e Y. Para avaliar o efeito do processo de sexagem na forma da cabeça do espermatozoide, nós também comparamos espermatozoides não sexados com pool de espermatozoide X e Y, usando a mesmas medidas realizadas para os grupos SX e SY. Os resultados demonstram pela primeira vez que o processo de sexagem afeta algumas características da forma da cabeça dos espermatozoides, tais como altura mínima, fator de forma, grau de circularidade, elongação, rugosidade e taxa de circularidade. Como os grupos SX e SY foram submetidos simultaneamente ao processo de separação, sendo obtidos do mesmo ejaculado, acredita-se que as alterações induzidas pelo processo de sexagem tiveram efeito similar nos grupos SX e SY. Isto é reforçado pelo fato de que não foi encontrada qualquer diferença entre estes dois grupos nas 23 medidas realizadas.

Pode-se especular que as diferenças entre os grupos NS e SXY, podem estar relacionas a modificações na membrana plasmática. A membrana plasmática dos espermatozoides é composta por diferentes proteínas, fosfolipídios, colesterol e outros componentes (FLESCH; GADELLA, 2000). É conhecido que durante o processo de capacitação, diversas proteínas são removidas ou redistribuídas entre as diferentes regiões da membrana plasmática, provocando modificação em sua estrutura (DE LAMIRANDE; LECLERC; GAGNON, 1997; FLESCH; GADELLA, 2000). Há evidências de que o processo de sexagem pode induzir uma capacitação prematura (MOCE; GRAHAM; SCHENK, 2006), a qual poderia ser responsável por diferenças encontradas no presente estudo entre os grupos NS e SXY. De fato, foi identificada uma diferença na rugosidade de membrana entre os grupos NS e SXY, o qual pode estar relacionada a esta possível capacitação do espermatozoide sexado. Além disto, estas diferenças na forma da cabeça dos espermatozoides encontradas entre os grupos NS e SXY, associada a capacitação prematura, poderiam interferir na ligação dos espermatozoides as células da tuba uterina, durante a formação dos reservatórios espermáticos no trato

reprodutivo da fêmea, o que poderia justificar menores taxas de concepção ou gestação encontrada após a IA utilizando sêmen sexado (DEJARNETTE et al., 2010, 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013).

3.5 Conclusão

Neste trabalho foi avaliada a possível diferença existente entre espermatozoides contendo os cromossomo X e Y. Embora nenhuma diferença nas 23 características individuais foi identificada entre os grupos, quando todas as características avaliadas foram agrupadas através de análise estatística discriminante, foi possível distinguir com 100% de exatidão espermatozoides que possuem cromossomo X ou Y. A separação evidente entres espermatozoides X e Y, somente foi possível devido à alta precisão do equipamento associada a análise discriminante. O conhecimento desta diferença entre espermatozoides X e Y pode melhorar o entendimento da biologia espermática, além de contribuir como base teórica no desenvolvimento de um método alternativo para sexagem espermática.

Referências

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

BERDYYEVA, T.; WOODWORTH, C.D.; SOKOLOV, I. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope. **Ultramicroscopy,** Amsterdam, v. 102, p. 189-198, 2005.

BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, Ridge, v. 56, p. 930-933, 1986.

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

BONATTO, C.B.; MAGALHÃES, B.S.; BRANCO, J.O.; DURIGON, E.L.; SILVA, L.P. Shape and size of red blood cells from the Pygoscelid penguins of Antarctica using atomic force microscopy. **Polar Biology,** Berlin, v. 32, p. 287-293, 2009.

CUI, K.H.; MATHEWS, C.D. X larger than y. **Nature,** London, v. 366, p. 2, 1993.

CUI, K.H. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. **Molecular Human Reproduction,**Oxford, v. 3, p. 61-67, 1997.

DEJARNETTE, J.M.; LEACH, M.A.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MCCLEARY, C.R.; MORENO, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 94, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J.M.; MCCLEARY, C.R.; LEACH, M.A.; MORENO, J.F.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 93, p. 4079-4085, 2010.

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

ELLIS, D.J.; SHADAN, S.; JAMES, P.S.; HENDERSON, R.M.; EDWARDSON, J.M.; HUTCHINGS, A.; JONES, R. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. **Jounal of Structural Biology,** San diego, v. 138, p. 187-198, 2002.

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

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,** Madson, v. 28, p. 312-321, 1983.

HEALY, A.A.; HOUSE, J.K.; THOMSON, P.C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 96, p. 1905-1914, 2013.

IERARDI, V.; NICCOLINI, A.; ALDERIGHI, M.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; SOLARO, R. AFM characterization of rabbit spermatozoa. **Microscopy Research and Technique,** New York, v. 71, p. 29-535, 2008.

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

JOSHI, N.; MEDINA, H.; CRUZ, I.; OSUNA, J. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterility,** New York, v. 75, p. 961-965, 2001.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals,**Berlin, v. 42, p. 63-67, 2007.

KUMAR, S.; CHAUDHURY, K.; SEN, P.; GUHA, S.K. Atomic force microscopy: a powerful tool for high-resolution imaging of spermatozoa. **Journal of Nanobiotechnology,** London, v. 3, p. 3-9, 2005

MAI, A.; WEERACHATYANUKUL, W.; TOMIETTO, M.; WAYNER, D.D.; WELLS, G.; BALHORN, R.; LEADER, A.; CYR, J.L.; TANPHAICHITR, N. Use of atomic force

microscopy for morphological and morphometric analyses of acrosome intact and acrosome-reacted human sperm. **Molecular Reproduction and Development,** New York, v. 63, p. 471-479, 2002.

MELLADO, M.; CORONEL, F.; ESTRADA, A.; RIOS, F.G. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. **Tropical Animal Health Production,** Edinburgh, v. 42, p. 1493-1496, 2010.

MOCE, 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,** New York, v. 66, p. 929-936, 2006.

PAINTER, T.S. Further Observations on the Sex Chromosomes of Mammals. **Science**, Washington, v. 58, p. 247-248, 1923.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RATY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMAKI, H.; SAIRANEN, A.; MAKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 111, p. 80-92, 2009.

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,** New York, v. 50, p. 323-327, 1998.

SAEKI, K.; SUMITOMO, N.; NAGATA, Y.; KATO, N.; HOSOI, Y.; MATSUMOTO, K.; IRITANI, A. Fine surface structure of bovine acrosome-intact and reacted spermatozoa observed by atomic force microscopy. **Journal of Reproduction and Development,** Tokyo, v. 51, p. 293-298, 2005.

SALES, J.N.; NEVES, K.A.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SA FILHO, M.F.; BARUSELLI. P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology,** New York, v. 76, p. 427-435, 2011.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; 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,** Belo Horizonte, v. 1, p. 86-90, 2004.

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

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

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, p. 171-175, 2010b.

VAN MUNSTER, E.B.; STAP, J.; HOEBE, R.A.; TE MEERMAN, G.J.; ATEN, J.A. Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. **Cytometry,** New York, v. 35, p. 125-128, 1999.

ZAVACZKI, Z.; CELIK-OZENCI, C.; OVARI, L.; JAKAB, A.; SATI, G.L.; WARD, D.C.; HUSZAR, G. Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. **Fertility and Sterility,** New York, v. 85, p. 121-127, 2006.

4 SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO ALTERA CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À VIABILIDADE ESPERMÁTICA E COMPROMETE SUA LIGAÇÃO ÀS CÉLULAS DA TUBA UTERINA

Resumo

Este estudo avaliou o efeito da sexagem espermática na longevidade e capacidade dos espermatozoides de se ligarem às células da tuba uterina (CTU), características fundamentais para a fecundação in vivo. Um ejaculado de cada touro Nelore (n=4) foi separado em três frações: não sexado (NS), sexado X (X) e sexado Y (Y). Um quarto grupo foi formado pelo pool de espermatozoide sexado X e Y (XY). Amostras de cada grupo foram avaliadas para a viabilidade espermática após a descongelação (0-), após a lavagem (0) e às 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético. Em cada momento, foi avaliada a motilidade e motilidade progressiva por análise computadorizada (CASA), estabilidade de membrana plasmática (MP; merocianina 540), integridade de MP (Sybr green), integridade acrossomal (PNA) e potencial de membrana mitocondrial (Mitotracker green) em citômetro de fluxo. Para o teste de ligação, espermatozoides de cada grupo/touro foram incubados por 30 min e 24 h com agregados CTU (n=200-275 por grupo/tempo), sendo fotografados para contagem do número de espermatozoides ligados por mm de agregado. Os dados foram analisados em modelo linear do SAS$^{(R)}$ ($P<0,05$). A porcentagem de espermatozoides móveis (58,1±4,3 e 35,2±4,4), com motilidade progressiva (46,1±6,1 e 25,7±4,8), MP íntegra (91,0±3,9 e 79,5±6,0), com potencial mitocondrial (79,2±9,3 e 69,0±10,6), MP estável (77,4±4,6e 19,4±4,2) e vivo com acrossoma íntegro (57,2±8,5 e 31,3±7,9) foi maior no grupo NS do que em XY. Além disto, a porcentagem de espermatozoides com MP desestabilizada e vivo com acrossoma reagido foi maior no grupo XY (65,7±5,5 e 35,6±8,9) do que no NS (2,5±0,9 e 15,7±3,8). Estas diferenças se mantiveram até às 8 h de incubação. Entretanto, às 12 h a qualidade espermática foi semelhante entre os grupos. Comparando os grupos X e Y, após a lavagem o grupo X (56,6±13,9) apresentou uma maior porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial do que o Y (41,7±13,8), e maior porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma reagido às 0, 2 e 4 h de incubação. O processo de sexagem não afetou a ligação dos espermatozoides após 30 min de incubação. Entretanto, após 24 h, o grupo XY (6,7±2,0) apresentou menor quantidade de espermatozoides ligados às CTU do que o grupo NS (23,6±7,2). O grupo Y (84,9±17,0) após 30 min, apresentou maior quantidade de

espermatozoides ligados do que o grupo X (72,1±20,3), não havendo diferença após 24 h. Conclui-se que o processo de sexagem afetou características estruturais da célula espermática, induzindo uma capacitação e reação acrossômica. Porém, ao longo de 12 h em meio de cultivo, a cinética foi semelhante à do sêmen convencional. Além disso, o processo de sexagem comprometeu a capacidade dos espermatozoides de se manterem ligados às CTU. Em relação aos espermatozoides X e Y, foi identificada uma menor capacidade do grupo X de se ligarem às CTU, assim como uma diferença em características relacionadas à motilidade e acrossoma.

Palavras chaves: Bovino, Capacitação, tuba uterina

Abstract

This study assessed the effect of sorting process in sperm survival and in its capacity to bind to oviduct cells, which are essential for in vivo fertilization. Each ejaculate of Nelore bulls (n=4) was collected and separated into three fractions: non-sexed (NS), sexed for X-sperm (SX), and sexed for Y-sperm (SY). A fourth group was formed by pooling SX and SY samples (SXY). Semen from each group was assessed for sperm viability after thawing (0-), after washing (0) and 2, 4, 8 and 12 hours of the incubation in synthetic oviduct fluid. In each moment, the samples were analyzed for sperm motility by computer-assisted semen analysis (CASA), plasma membrane stability (PM, merocyanine 540), PM integrity (Syber green), acrosomal integrity (PNA) and mitochondrial membrane potential (Mitotracker green) in flow cytometer. For sperm binding test, sperm from each group/bull was incubated for 30 minutes and 24 hours with oviduct explants. Data were analyzed using generalized linear models (SAS$^{(R)}$,P<0,05). The percentage of sperm motility (58.1±4.3 e 35.2±4.4), progressive motility (46.1±6.1 e 25.7±4.8), PM integrity (91.0±3.9 e 79.5±6.0), mitochondrial membrane potential (79.2±9.3 e 69.0±10.6), PM stability (77.4±4.6 e 19.4±4.2), and live sperm with intact acrosome (57.2±8.5 e 31.3±7.9) were higher in non sexed than in sexed sperm. Moreover, percentage of sperm with PM destabilized and live sperm with reacted acrosome was higher in sexed sperm than in non sexed. Those differences were kept up to 8h of incubation. However, after 12h sperm quality was similar between groups. Comparing the X and Y groups, after wash the X sperm (56.6±13.9) had higher percentage of sperm with mitochondrial potential than Y sperm (41.7±13.8), and higher percentage of live sperm with reacted acrosome at 0, 2 and 4h of the incubation. The sexing process did not affect the sperm binding to the oviduct cells after 30 minutes. However, after 24 h, the XY group (6.7±2.0) had

less sperm bound in oviduct explants than NS group (23.6±7.2).After 30 minutes, the Y group (84.9±17.0), showed higher number of sperm bound than X group (72.1±20.3), bud did not differ after 24h. In conclusion, sexing process affected structural characteristics of the sperm cell, inducing a capacitaion status and acrosome reaction. However, during the 12 h of incubation in culture medium, the kinetics was similar between sexed and non sexed sperm. Moreover, the sexing process affected the capacity of the sperm to remain bound to the oviduct explants. Regarding to X and Y sperm, it was identify a lower capacity of the X group to bind to the oviduct explants, as well as a difference in characteristics related to motility and acrosome.
Keywords: Bovine, Capacitation, Oviduct

4.1 Introdução

Desde que o processo de sexagem por citometria de fluxo foi desenvolvido e disponibilizado para a produção e a comercialização do sêmen sexado, diversos estudos tem sido feitos testando o uso deste sêmen in vitro ou in vivo. Embora alguns estudos tenham identificado uma menor taxa de blastocisto quando o sêmen sexado foi utilizado (MORTON et a., 2005; PALMA et al., 2008), as melhorias no processo de sexagem (SHARPE ; EVANS, 2009) e alterações nos protocolos de PIVE ou preparação espermática (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; VILLAMIL et al., 2012) têm permitido uma aumento na produção de embriões, alcançando taxas semelhantes às obtidas com sêmen não sexado (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). De fato, em um estudo realizado em nosso laboratório (CARVALHO et al., 2010), foi identificado que apesar de o processo de sexagem afetar algumas características estruturais da célula espermática, isto não comprometeu sua capacidade de fecundar e produzir embriões in vitro. Entretanto, alto custo e reduzida fertilidade em programas de inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013), continuam sendo um problema no uso do sêmen sexado in vivo. Uma possibilidade para explicar esse problema é de que o processo de sexagem causaria um dano espermático que não afeta a taxa de fecundação ou produção de blastocisto in vitro, mas que poderia influenciar a taxa de concepção e gestação quando

utilizado in vivo. Uma destas alterações poderia ser no padrão de metilação, já que alteração nos níveis de metilação dos espermatozoides sexados prejudicaria a reprogramação nuclear dos embriões, gerando problemas no desenvolvimento e na implantação. Entretanto, um estudo recente (CARVALHO et al., 2012), mostrou que a sexagem não afetou o padrão de metilação dos espermatozoides sexados, sugerindo que outros fatores devem estar envolvidos na redução da prenhez observada in vivo.

Estes resultados, associados ao fato de as condições à que os espermatozoides são submetido na fecundação in vitro serem bastante distintas das in vivo, sugerem que o processo de sexagem pode comprometer outros parâmetros que, embora não sejam tão importantes para a fecundação in vitro sejam fundamentais para que a fecundação in vivo ocorra com sucesso. Dentre esses, destaca-se o tempo de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea e a capacidade de ligação às células da tuba uterina (CTU) para formação dos reservatórios espermáticos. Há evidências de que o processo de sexagem pode induzir uma lesão da membrana plasmática e reação acrossômica (MOCE; GRAHAM; SCHENK, 2006; BLONDIM et al., 2009; CARVALHO et al., 2010), sendo que após a reação acrossômica, o espermatozoide sofre uma cascata de eventos que culminam com sua morte. Portanto, é possível que os espermatozoides sexados se mantenham viáveis por menos tempo, comprometendo a taxa de fecundação. Além disto, recentemente foi identificado que o processo de sexagem altera a forma da cabeça dos espermatozoides, assim como algumas características de sua superfície (CARVALHO et al., 2013). A associação da alteração da forma da cabeça dos espermatozoides, juntamente com a capacitação prematura causada pelo processo de sexagem, poderia provocar a perda de algumas proteínas de membrana que estariam relacionadas à formação e manutenção dos reservatórios espermáticos.

Portanto, a avalição do tempo de sobrevivência e capacidade de se ligar aos reservatórios espermáticos na tuba uterina, podem fornecer informações importantes relacionadas às características fisiológicas necessárias para fecundação in vivo. Entretanto, devido à dificuldade da realização de estudos in vivo relacionados ao tempo de viabilidade espermática no trato reprodutivo da fêmea e da capacidade de ligação dos espermatozoides as CTU, este estudo teve o objetivo de avaliar essas características in vitro.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Delineamento experimental

Sêmen congelado de quatro touros da raça Nelore foi utilizado no presente estudo. Para a produção desse material experimental, um ejaculado de cada touro foi coletado, e fracionado em três partes. Uma parte foi congelada (sêmen não sexado - grupo NS) e as outras duas foram separadas por citometria de fluxo para grupos com espermatozoide contendo cromossomo X ou Y (grupo X e grupo Y, respectivamente) e posteriormente congelada. Todo o trabalho foi realizado por empresa comercial (ABS Pecplan, Uberaba, SP, Brasil), de acordo com o procedimento padrão da empresa. O sêmen foi então utilizado para avaliação da cinética espermática em meio de cultivo e capacidade de ligação dos espermatozoides às CTU. Para ambos os experimentos, foi feita uma repetição por touro, sendo o touro considerado como réplica. Em cada repetição, uma palheta de sêmen de cada grupo (NS, X e Y) foi descongelada e um quarto grupo foi constituído pela formação de um pool contendo uma fração do sêmen X e do Y (grupo XY).

No primeiro experimento foi avaliada a cinética espermática em meio de cultivo. As amostras de cada grupo foram descongeladas, lavadas por centrifugação e incubadas por até 12 h. Amostras foram avaliadas logo após a descongelação (momento 0-), após lavagem (momento 0) e após 2, 4, 8 e 12 h de incubação (momento 2, 4, 8 e 12). Em cada momento foram avaliadas a motilidade total e motilidade progressiva por análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade de membrana plasmática, utilizando citômetro de fluxo.

No segundo experimento foi testada a capacidade do espermatozoide sexado de se ligar às CTU. Para esse teste, espermatozoides foram incubados com agregados dessas células por 30 min e 24 h, quando então foi avaliado o número de espermatozoides ligados por mm de agregado celular. Para cada touro/momento de incubação foram utilizados 90 agregados celulares, divididos igualmente em três gotas de cultivo.

4.2.2 Amostras de sêmen

Todo o processo de sexagem e congelação foram realizados conforme descrito no capítulo 1 (Item 2.2.1).

4.2.3 Preparação e incubação dos espermatozoides em meio de cultivo

Após a descongelação (momento 0-), foi retirada uma amostra de sêmen de cada grupo (NS, XY, X e Y) para avaliação das características espermáticas em citômetro de fluxo e do movimento espermático no CASA. O restante da amostra foi lavado por 5 min a 700 G em 1 mL de fluido de oviduto sintético (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodio tri citrato, 2,77 mM myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci) (HOLM et al., 1998). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, sendo o pellet resuspendido em meio SOF. Após a lavagem (momento 0), foi retirada uma amostra para as mesmas avaliações realizadas após a descongelação. O restante da amostra foi incubado em microtubo tipo eppendorf, contendo 200 µL de meio SOF sob óleo de silicone (Alphatec, Cutitiba, Brasil) por 2, 4, 8 e 12 h (momento 2, 4, 8 e 12, respectivamente), sendo utilizado um microtubo para cada momento. A concentração final de espermatozoides durante a incubação foi de 2 x 10^6espermatozoides/mL. Em cada momento, um microtubo contendo os espermatozoides, foi centrifugado por 5 min a 700 G. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi resuspendido em meio SOF e avaliado para as mesmas características dos momentos anteriores.

4.2.4 Avaliação de motilidade e motilidade progressiva

A motilidade espermática foi determinada por análise computadorizada do movimento espermático (CASA, Sperm Analysis System, Ivos-Ultimate 12's, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino (Anexo B). Para a avaliação da motilidade, dez microlitros de sêmen foram colocados em uma câmara de Makler®, previamente aquecida a 37 ºC. No mínimo, três campos foram selecionados para a leitura e análise da motilidade total (%) e motilidade progressiva (%).

4.2.5 Avaliação dos espermatozoides em citômetro de fluxo

As análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez de membrana plasmática e potencial mitocondrial dos espermatozoides foram realizadas por citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, São José, CA, EUA), contando-se 5.000 células por análise/animal/tempo de incubação. Foi realizada avaliação da integridade acrossomal com peannut aglutinnin (PNA) e iodeto de propídeo (IP), fluidez de membrana com merocianina 540 (M540) e potencial mitocondrial com mitotracker green e Yo-pro-1. As concentrações e diluições dos sondas fluorescentes estão descritas no anexo C.

Para definir as populações espermáticas e/ou debris, foram utilizados o Forward-Scatter-Cluster-Height (FSC-H) e o Side-Scatter-Cluster-Height (SSC-H), no gráfico de pontos, com base em diferenças de tamanho e complexidade (CHEUQUEMA et al., 2012). Os dados fornecidos em pontos bi-dimensionais numa escala logarítmica foram analisados pelo software CFlow Plus®.

Em cada análise, uma amostra de sêmen foi adicionada a microtubos pré-aquecidos a 37 °C, os quais continham soluções com as sondas fluorescentes para as respectivas análises e incubadas por 8 min a 39 ºC.

4.2.6 Coleta e processamento das células da tuba uterina

Os agregados celulares foram coletados e processados de acordo com De Pauw et al. (2002) e Kadirvel et al. (2012), com modificações. Complexos de tuba uterina e ovário foram coletados em abatedouro e transportados em solução salina (NaCl 0,9%) aquecida à 35 ºC, suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50 µg/mL). No laboratório, as tubas uterinas foram separadas e dissecadas de tecidos adjacentes, sendo que para cada dia de manipulação, foram selecionadas 10-20 tubas, no qual os ovários adjacentes não continham corpo lúteo. Após dissecação das tubas uterinas, a região do istmo foi separada, considerando até 4 cm a partir da junção útero-tubárica, para coleta das células. Com o auxílio de uma seringa de insulina, foi feita uma lavagem do interior da tuba uterina, com 1 mL de meio TALP (TCM-199 com sais de Hank´s, Gibco BRL®, suplementado com 10% de soro fetal bovino, SFB, Gibco BRL® e amicacina a 100 UI/mL). Após a coleta, as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL, sendo lavadas duas vezes com 5-10 mL de meio TALP. Entre as lavagens, as células foram desagregadas com uma pipeta

automática de 10 mL (após a primeira lavagem) ou escalpe de 19 gauge acoplado a uma seringa de 10 mL (após segunda lavagem). As células desagregadas foram transferidas para uma placa de petri de 100 mm com volume final de 25 mL de meio TALP e mantidas em cultivo por aproximadamente 24 h a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar para formação de agregados celulares (Figura 1). Após 6 a 8 h foi realizada uma troca do meio de cultivo.

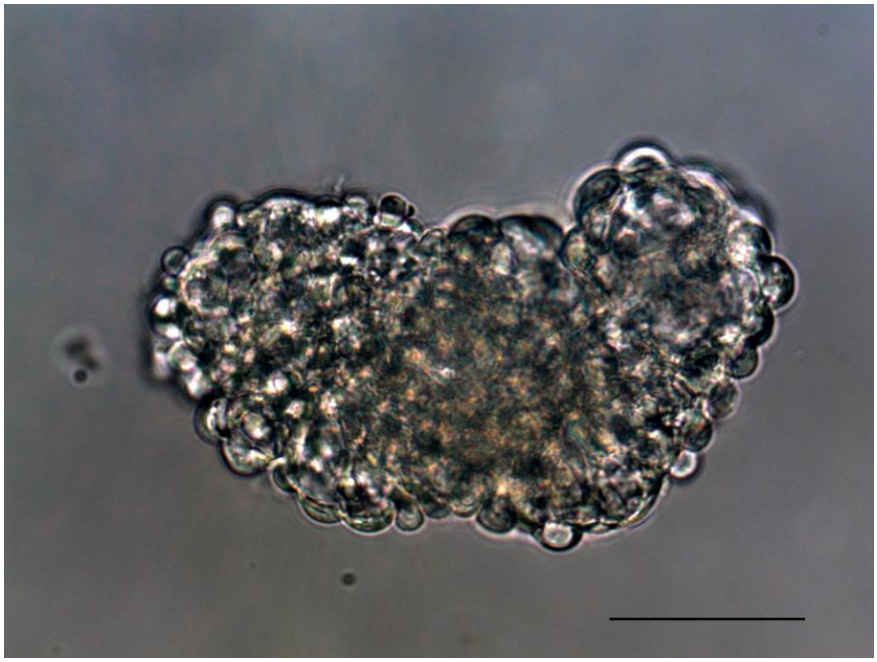

Figura 1 - Fotografia de contraste de fase em aumento de 40x, de um agregado celular esférico, proveniente de células da tuba uterina, após aproximadamente 24 h de cultivo. Agregados semelhantes a este, contendo entre 150-450 µm de perímetro, foram utilizados para co-incubação e contagem do número de espermatozoides ligados por mm de agregado. Barra de 50 µm.

4.2.7 Avaliação do número de espermatozoides ligados às células da tuba uterina

Para cada um dos quatro grupos, 180 agregados esféricos, com perímetro de 150-450 µm foram distribuídos igualmente em seis gotas de 50 µL de sp-TALP, sob óleo de silicone. Uma palheta de sêmen de cada grupo foi descongelada a 37 ºC por 30 s, sendo feita uma lavagem dos espermatozoides em SOF, conforme descrita anteriormente (Item 4.2.3). Após a lavagem foi feito contagem dos espermatozoides em hematocitômetro, e esses foram adicionados nas gotas de incubação em uma concentração final de 0,5 x 10^6 espermatozoides móveis/mL. Espermatozoides e agregados celulares foram incubados por 30 min ou 24 h em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Após a incubação, os complexos agregados-espermatozoides foram transferidos para uma gota de 30 µL de sp-TALP, sobre uma lâmina de vidro para captação das fotos. Para cada complexo agregado-espermatozoide (Figura 2 A) foram feitas duas fotografias utilizando câmera digital Zeiss Axioskop e Axio Cam HRc (Carl Zeiss,

Thornwood, NY). O número de espermatozoides ligados e o perímetro de cada agregado, foram avaliados utilizando AxioVision V 4.5 software (Figura 2 B; Carl Zeiss, Thornwood, NY). O número de espermatozoides ligados por milímetro (mm) de agregado foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides ligados pelo perímetro do agregado.

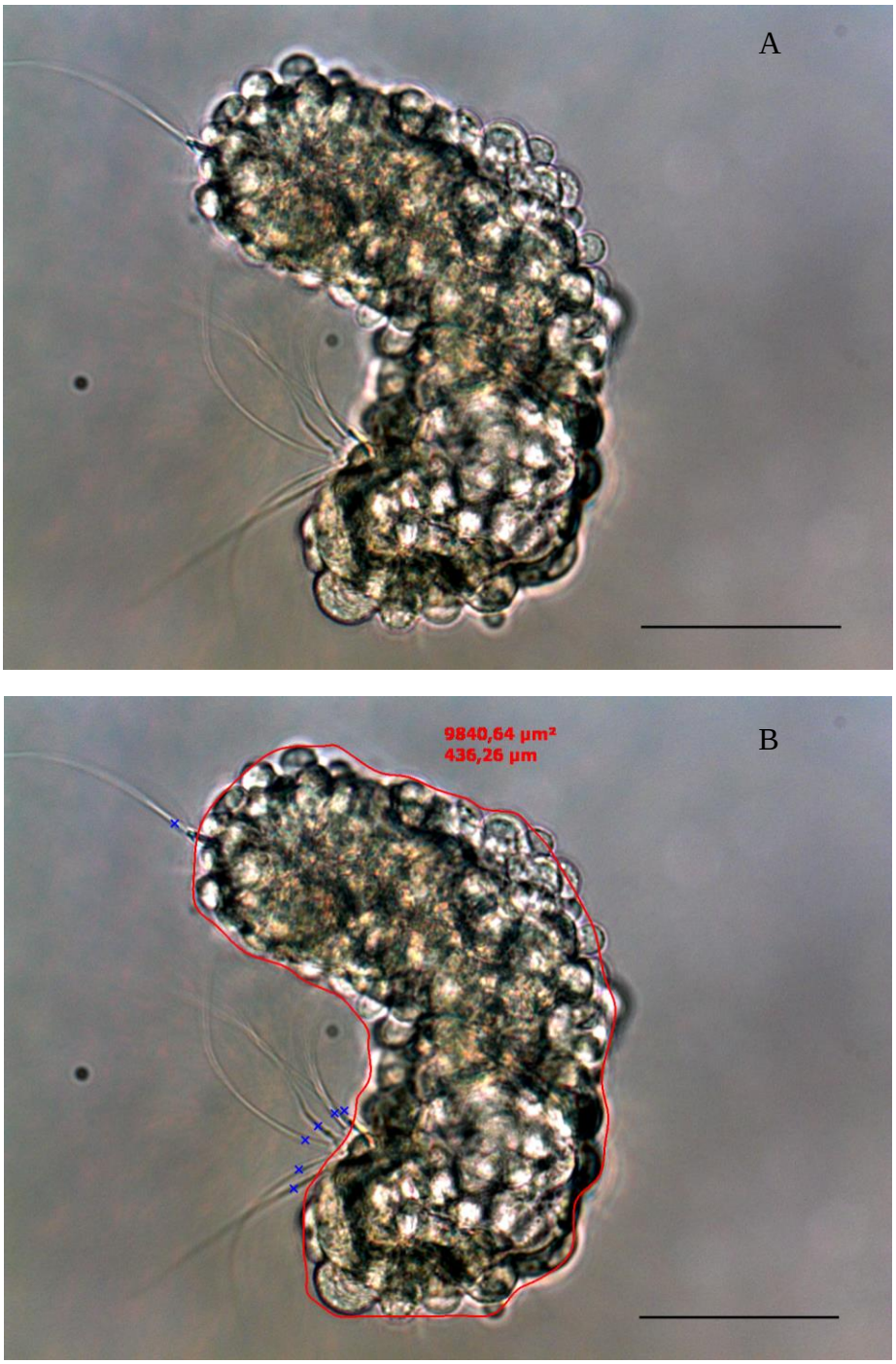

Figura 2 - Fotografia de contraste de fase em aumento de 40x, do complexo agregadode células da tuba uterina-espermatozoide, após 24 h de co-incubação com os espermatozoides (A) e após a contagem dos espermatozoides (marcados com um "x" em azul) e medição do perímetro do agregado (linha em vermelho) para avaliação do número de espermatozoides ligados por milímetro (mm) de agregado (B). Barra de 50 µm.

4.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística das variáveis relacionadas às avaliações espermáticas nos diferentes momentos de incubação e número de espermatozoides ligados às CTU, foi utilizada uma estrutura de medidas repetidas com sujeito definido como touro*tratamento*tempo de incubação. Na análise estatística utilizou-se o procedimento GLIMMIX (análise de variância) do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados considerando para as variáveis de contagem uma Poisson, com funções de logarítmica. As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ± erro padrão (EP), utilizando uma réplica por touro, sendo cada touro considerado uma repetição. A comparação foi feita utilizando teste de Tukey-Kramer com nível de significância de $\alpha = 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Avaliação da cinética espermática em meio de cultivo

4.3.1.1 Motilidade e motilidade progressiva

As porcentagens de motilidade e motilidade progressiva estão representadas na Figura 3. Em relação à motilidade total (Figura 3 A) e motilidade progressiva (Figura 3 B), o grupo NS foi superior em todos os momentos de avaliação, exceto após as 12 h de incubação, quando se igualou ao grupo XY em ambas as características. Apesar da diferença, a queda nos valores de motilidade em ambos os grupos foi semelhante ao longo das 12 h de incubação. Quando às mesmas comparações foram realizadas entre os grupos X e Y (Figura 3), foi encontrada uma maior motilidade progressiva (Figura 4 B) no grupo X logo após a lavagem (momento 0-). Para os outros momentos, o comportamento durante a incubação foi semelhante nos dois grupos (Figura 4).

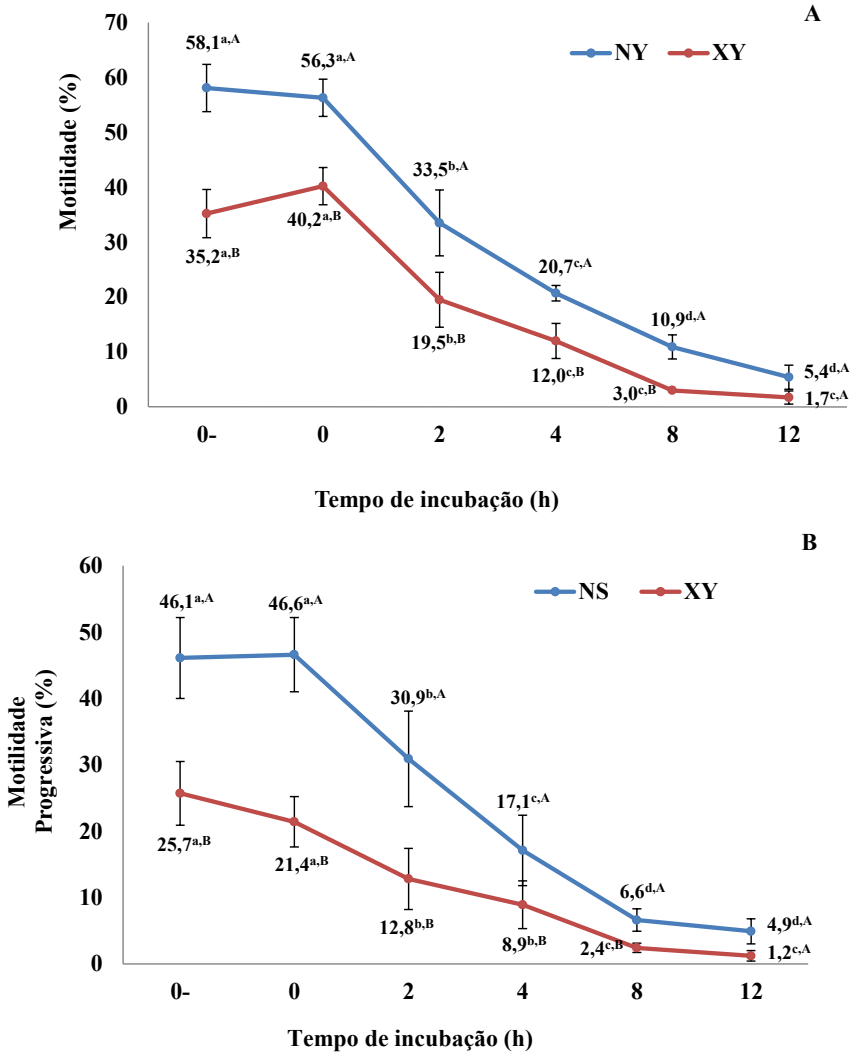

Figura 3 - Porcentagem de motilidade (A) e motilidade progressiva (B) de espermatozoide não sexado (NS) e pool de sexado X e Y (XY) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos à 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). ^{a,b,c,d}Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). ^{A,B}Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

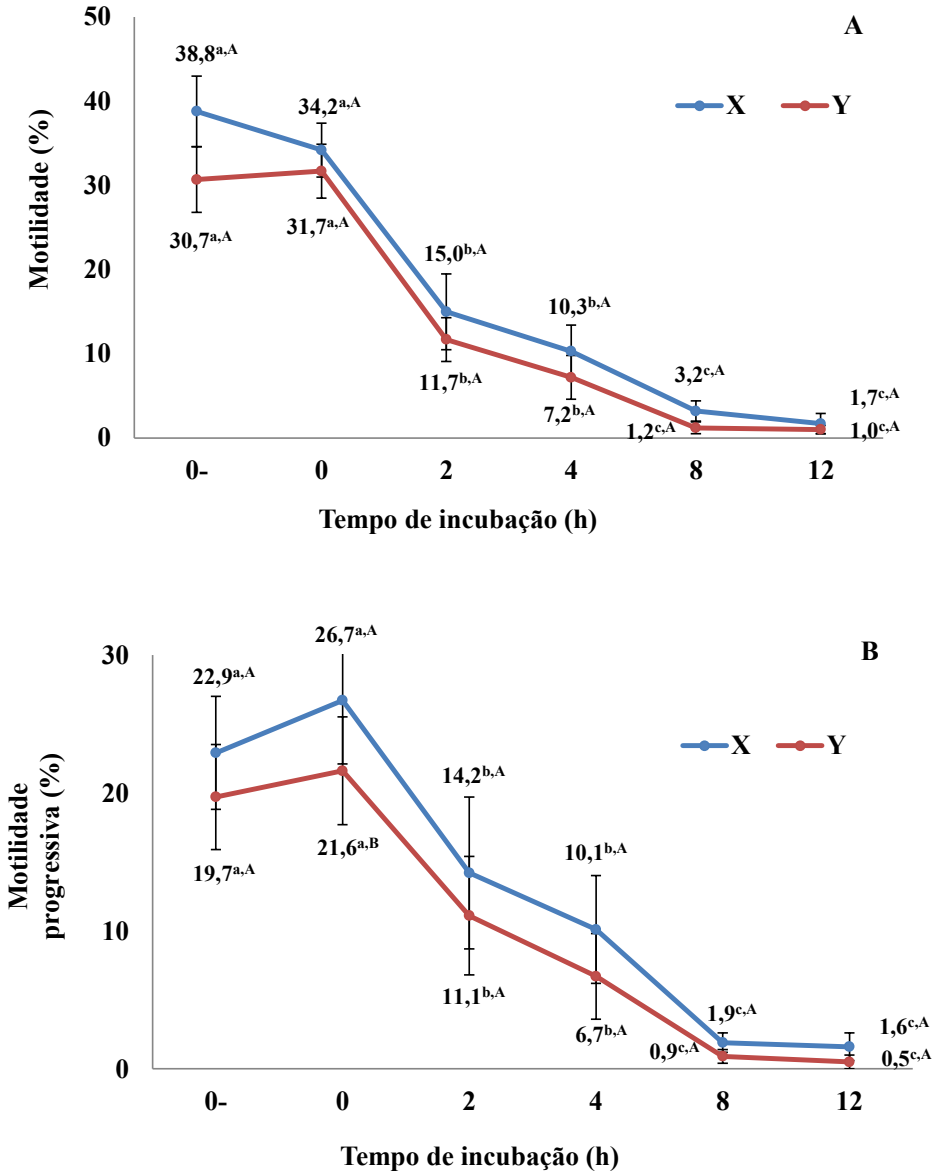

Figura 4 - Porcentagem de motilidade (A) e motilidade progressiva (B) de espermatozoide sexado X (X) e sexado Y (Y), após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). [a,b,c]Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05).

4.3.1.2 Potencial de membrana mitocondrial e estabilidade de membrana plasmática

A porcentagem de espermatozoides apresentando potencial de membrana mitocondrial foi maior no grupo NS do que o grupo XY em todos os momentos avaliados (Figura 5 A). Além disto, para ambos os grupo, foi observado efeito negativo da lavagem nessa característica, assim como queda após 2 h de incubação. Entre as 2, 4, 8 e 12 h de incubação a porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial, se manteve estável no grupo XY, enquanto o grupo NS apresentou queda ente 2 e 12 h de incubação. Na

comparação entre os grupos sexado X ou Y, foi encontrada uma maior porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial no grupo X do que no grupo Y (56,6 ± 13,9 e 41,7 ± 13,8, respectivamente) logo após a lavagem (Figura 5 B). Entretanto, ambos apresentaram queda semelhante ao longo das 12 h de incubação.

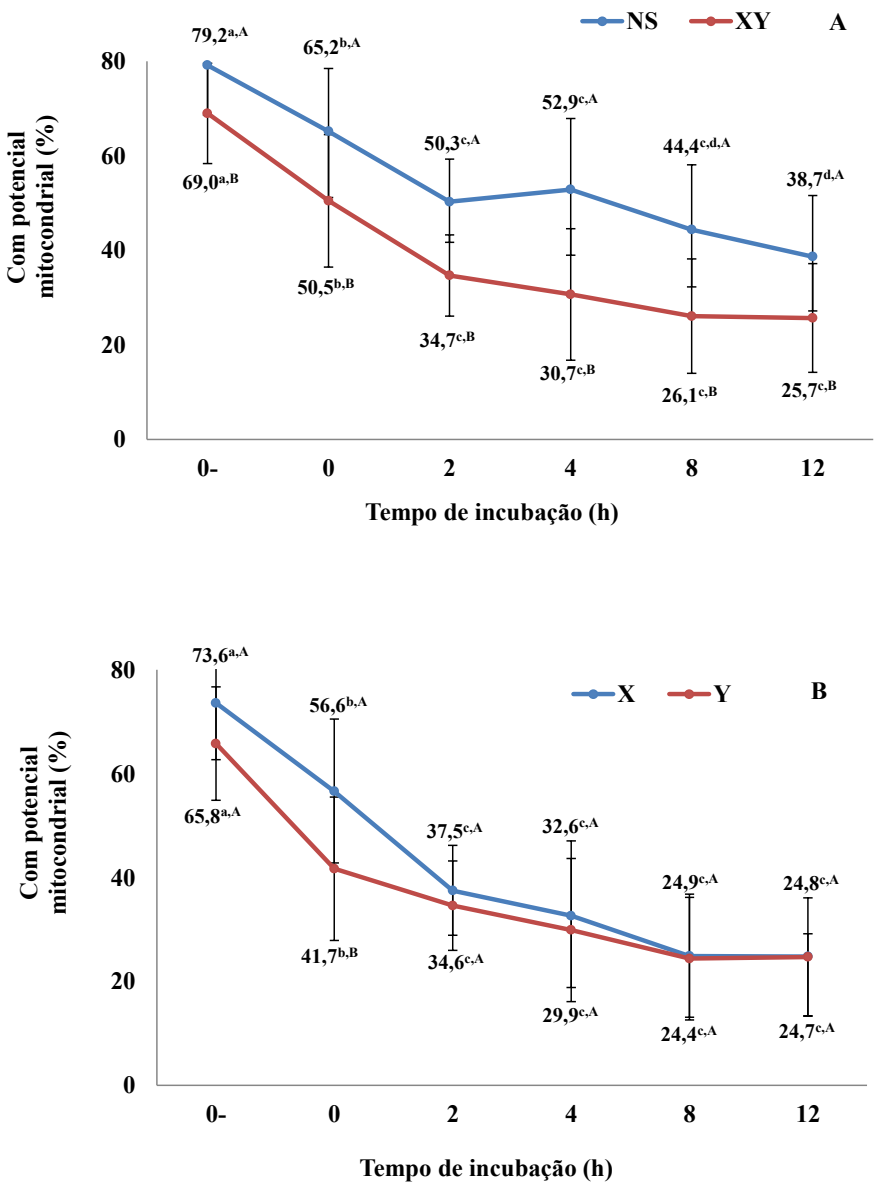

Figura 5 - Porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides não sexados, pool de sexados X e Y (XY, A), sexado (B) X (X) e sexado Y (B) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). [a,b,c,d]Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). [A,B]Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

Em relação à estabilidade de membrana plasmática (MP), foi identificado que o processo de sexagem induz uma desestabilização da membrama, com maior porcentagem de

espermatozoides com MP desestabilizada no grupo XY (19,4 ± 4,2 e 65,7 ± 0,6) em relação ao grupo NS (77,4 ± 4,6 e 2,5 ± 1,8) (Figura 6 A). Esta diferença entre os grupos NS e XY para ambas as características, se manteve ao longo das 12 h de incubação. Para a porcentagem de espermatozoides com MP desestabilizada, após 2 h de cultivo, o grupo NS apresentou aumento, enquanto o grupo XY apresentou uma queda (Figura 6 B), sendo que ambos se mantiveram estáveis após 2 h de incubação. Em relação ao sêmen sexado X ou Y, não houve diferença entre os grupos, para as características de estabilidade de MP (Figura 7 A).

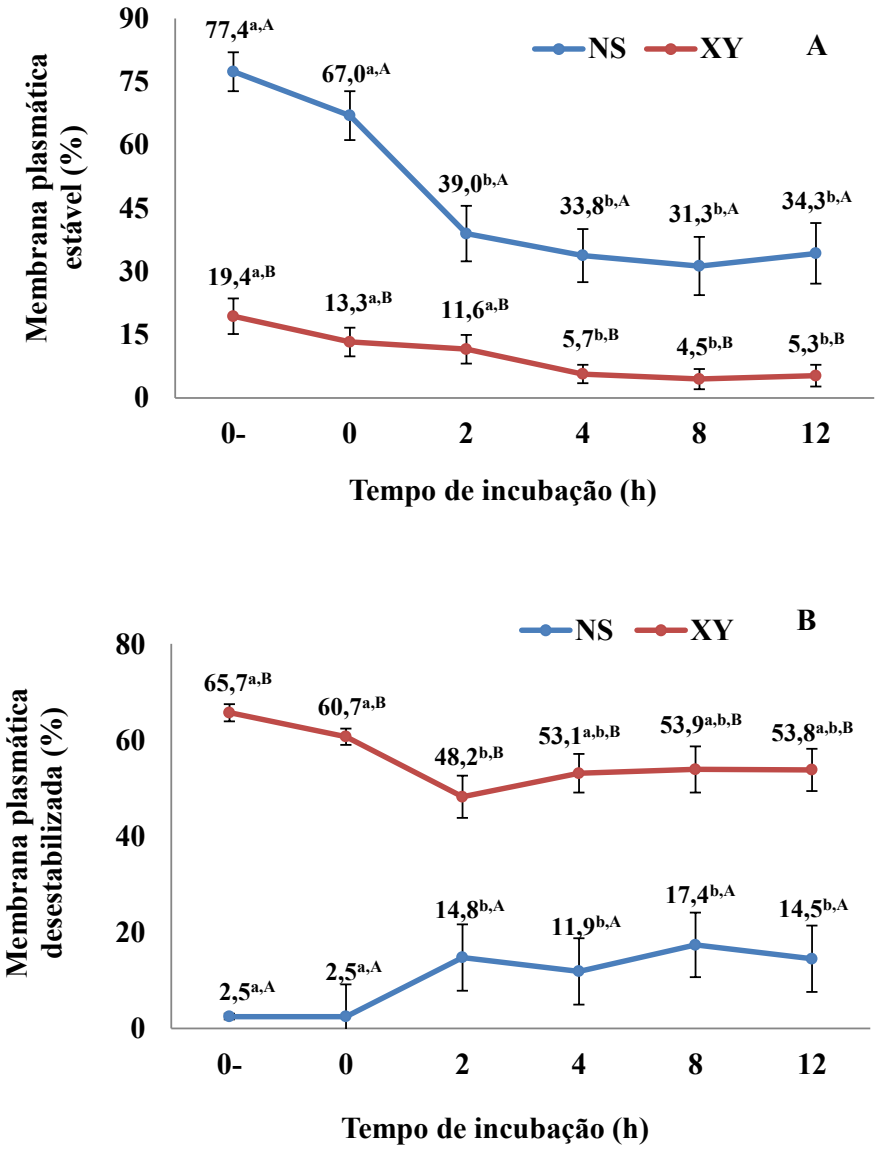

Figura 6 - Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática estável (A) e desestabilizada (B) em espermatozoides não sexados e pool de sexado X e Y (XY) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). [a,b]Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). [A,B]Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

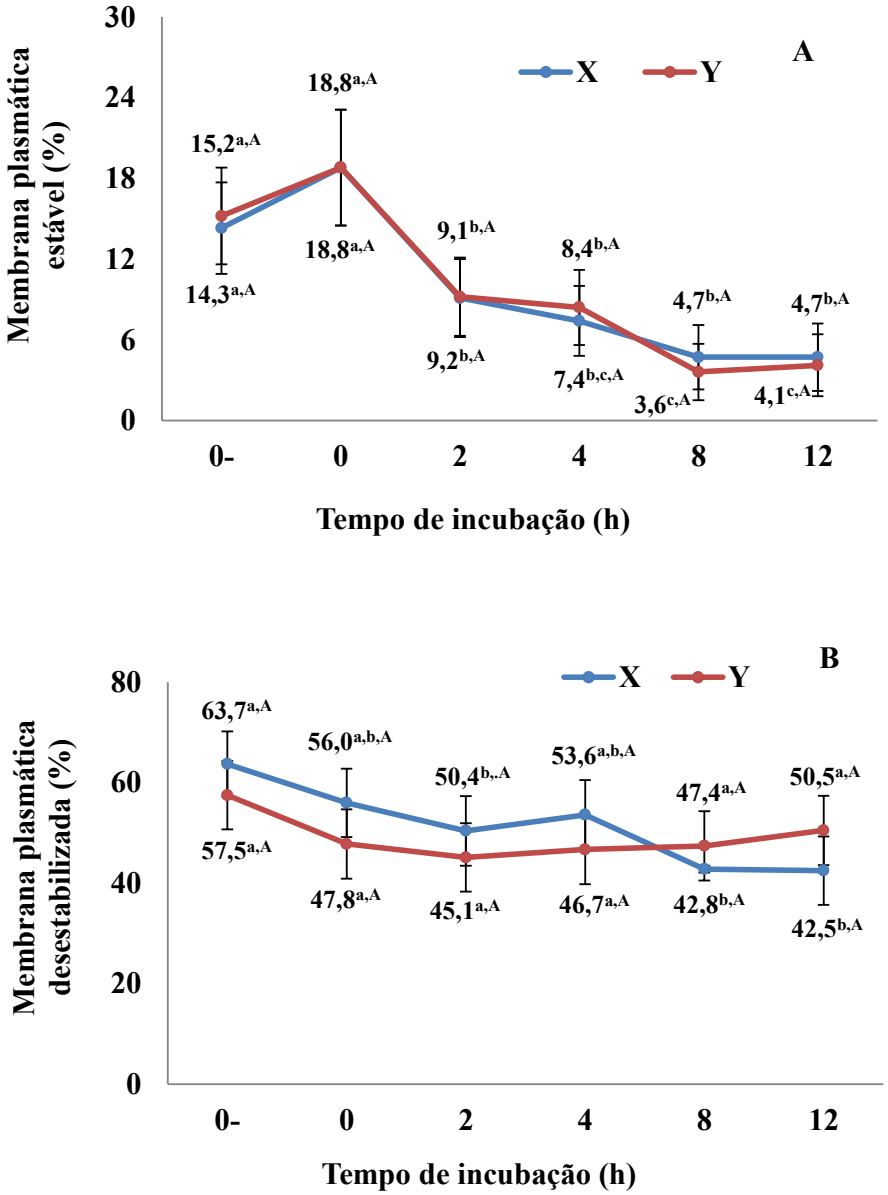

Figura 7 - Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática estável (A) e desestabilizada (B) em espermatozoides sexados X (X) e sexados Y (Y) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). [a,b]Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). [A,B]Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

4.3.1.3 Integridade de membrana acrossomal

A porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro ou reagido, para os grupos NS *vs* XY e X *vs* Y, os dados estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Logo após a descongelação, foi encontrada maior porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro no grupo NS em relação ao grupo XY, sendo que esta diferença se manteve até às 8 h de incubação (Figura 8 A). Ambos os grupos apresentaram curva semelhante ao longo das 12 h de cultivo, com queda brusca na porcentagem de espermatozoides vivos com

acrossoma íntegro após 2 h de cultivo. Em relação à espermatozoides com acrossoma reagido, foi encontrada uma menor porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido no grupo NS em relação ao grupo XY até as 4 h de incubação (Figura 8 B). Na comparação entre os grupos sexado X e sexado Y, não foi encontrada diferença na porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro (Figura 9 A). Já o grupo X, apresentou maior porcentagem de espermatozoides com acrosooma reagido após a lavagem e às 2 e 4 h de incubação, em relação ao grupo Y (Figura 9 B).

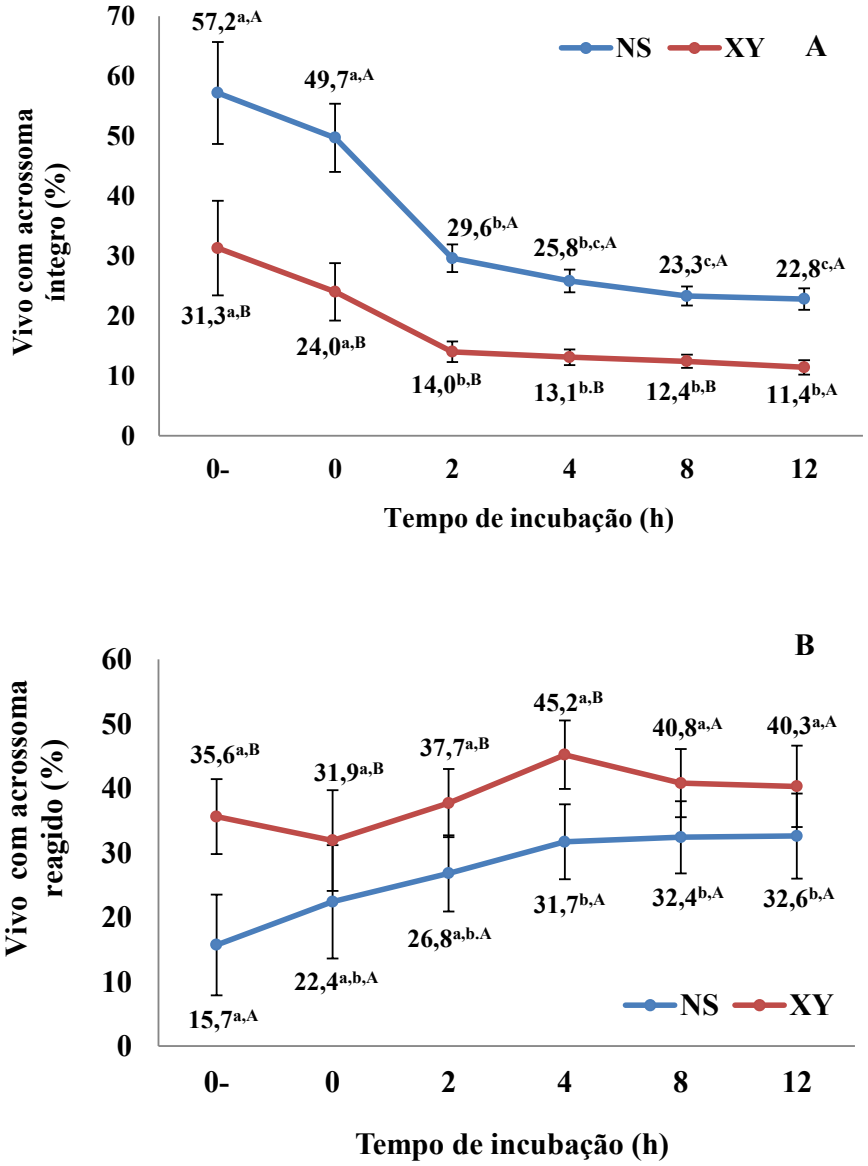

Figura 8 - Porcentagem de espermatozoides não sexados (NS) e pool de sexados X e Y (XY), vivos com acrossoma íntegro (A) ou reagido (B) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). [a,b,c]Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). [A,B]Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

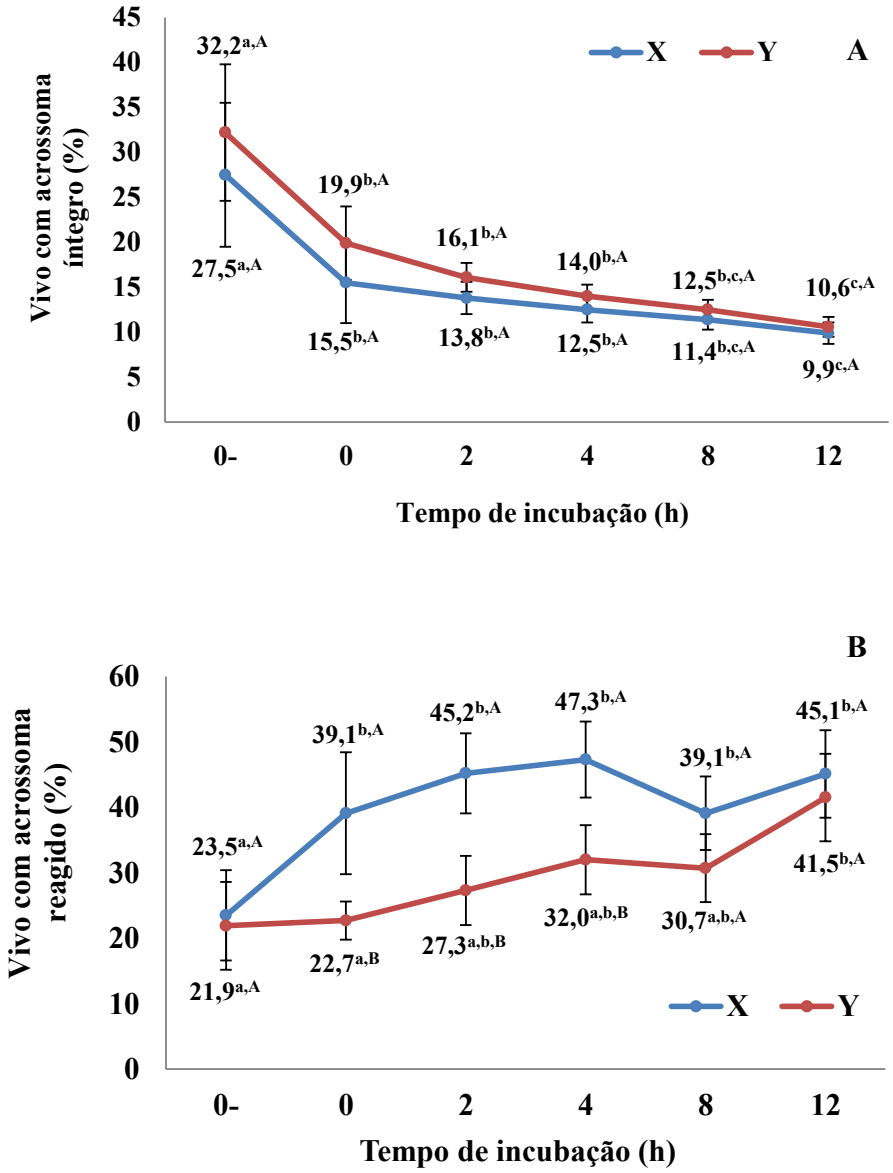

Figura 9 - Porcentagem de espermatozoides sexados X (X) e sexados Y (Y), vivos com acrossoma íntegro (A) ou reagido (B) após a descongelação (-0), lavagem (0) e 2, 4, 8 e 12 h de incubação em fluido de oviduto sintético mantidos em estufa a 39 ºC e 5% de CO_2 em ar. Média obtida a partir de 1 réplica por touro (n=4). ^{a,b,c}Diferença significativa entre momentos de incubação para cada grupo (P<0,05). ^{A,B}Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

4.3.1.4 Capacidade de ligação do espermatozoide sexado as células da tuba uterina

Usando 200-275 agregados celulares por cada grupo/tempo de incubação, foi identificado que os espermatozoides sexados possuem capacidade de se ligar às CTU, e que o processo de sexagem não afeta a ligação dos espermatozoides após 30 minutos de incubação (Figura 10 A). Entretanto, após 24 h de incubação, o grupo NS apresentou maior quantidade de espermatozoides ligados por mm de agregado do que o grupo XY (23,6 ± 7,2 e 6,7 ± 2,0, respectivamente; Figura 10 A). Na comparação entre os grupos X e Y, após 30 min de

incubação, o grupo Y (84,9 ± 17,0) apresentou maior quantidade de espermatozoides ligados em relação ao grupo X (72,1 ± 20,3), sendo que após as 24 h, o número de espermatozoides ligados foi semelhante entre X e Y (Figura 10 B).

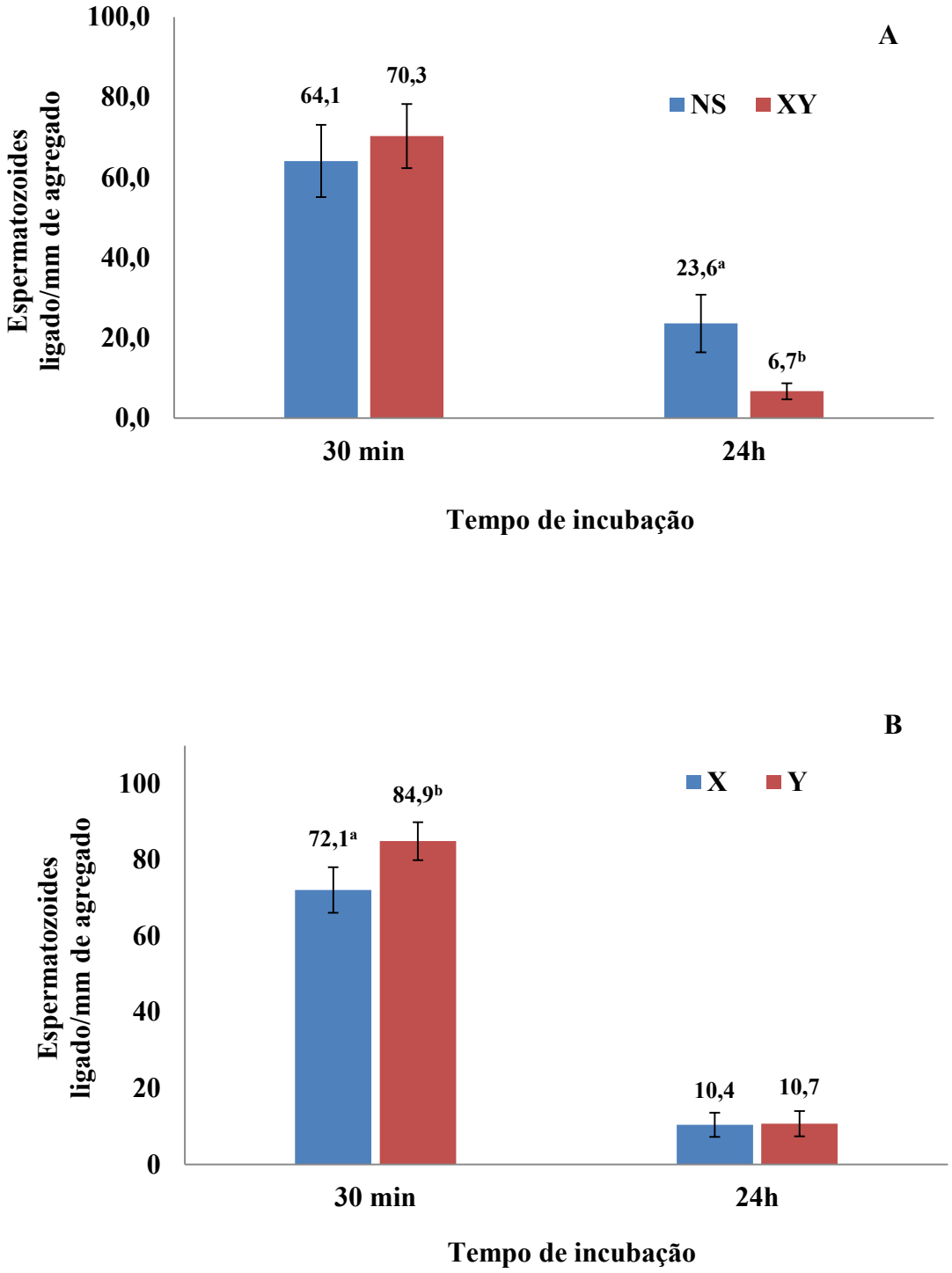

Figura 10 - Número de espermatozoides ligados por mm de agregado celular da tuba uterina, após 30 minutos ou 24 h de co-incubação dos agregados com espermatozoide não sexado (NS) e pool de sexado X e Y (XY; A) ou sexado X (X) e sexado Y (Y; B). Média obtida a partir 1 réplica por touro (n=4). [a,b]Diferença significativa entre grupos em cada momento (P<0,05).

4.4 Discussão

Em estudo realizado anteriormente em nosso laboratório (CARVALHO et al., 2010), foi demonstrado que o processo de sexagem espermática por citometria de fluxo afeta algumas características do espermatozoide, entretanto não afeta a capacidade de produzir embriões in vitro. É possível que os danos causados pelo processo de sexagem, possam não ser tão cruciais para as condições in vitro, em que altas concentrações de espermatozoides são colocados diretamente em contato com o ovócito. Entretanto, essas alterações poderiam explicar a redução na fertilidade in vivo utilizando IA, observada por alguns autores (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013). As condições a que os espermatozoides são submetidos in vivo são bastante distintas das in vitro, já que in vivo os espermatozoides precisam se deslocar por todo o trato reprodutivo da fêmea, chegando à tuba uterina para formar os reservatórios espermáticos, e esperarem até o momento da ovulação. Portanto, neste estudo foram avaliados parâmetros importantes para que os espermatozoides possam manter a capacidade de fecundar in vivo, tais como tempo de sobrevivência e capacidade de ligação às CTU para formação dos reservatórios espermáticos.

Para testar o tempo de sobrevivência dos espermatozoides sexados, assim como suas alterações ao longo do tempo, foram avaliadas diversas características em diferentes momentos de cultivo utilizando citômetro de fluxo. Estas avaliações forneceram informações importantes da fisiologia espermática ao longo das 12 h de incubação. Após a descongelação, a porcentagem de espermatozoides móveis, com motilidade progressiva, membrana plasmática estável e espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, foram menores para o sêmen sexado em relação ao sêmen não sexado. Estes resultados já eram esperados, considerando que estudos anteriores relataram efeito negativo da sexagem em diferentes características espermáticas (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Estes autores sugerem que os danos nos espermatozoides podem ser causados pela exposição ao corante Hoechst 33342 e posteriormente ao laser, a grande pressão na passagem pelo citômetro, à queda em grande velocidade dentro do tubo de coleta e/ou a permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes e durante o processo de sexagem.

Esta diferença encontrada após a descongelação, entre os espermatozoides sexado e não sexado se manteve ao longo de 8 h. Entretanto, a maior queda na qualidade espermática em todos os grupos, ocorreu após as 2 primeiras horas de incubação. Esta rápida diminuição da viabilidade espermática tem sido descrita em bovinos (ALOMAR et al., 2006) e equinos (CHOI et al., 2003). Entretanto, não se sabe exatamente qual a razão para morte rápida dos espermatozoides nas primeiras horas de incubação. Uma possível causa seria a maior fragilidade de uma subpopulação de espermatozoides após o processo de congelação, comprometendo a sua viabilidade. Após a criopreservação, aproximadamente metade dos espermatozoides morrem, enquanto parte da população que permanece viva pode ter sua capacidade de fecundar comprometida (WATSON, 2000). De fato, danos causados pela congelação têm sido relatados em sêmen sexado (KLINC; RATH, 2007; BLONDIN et al., 2009) e não sexado (WATSON, 1995; MARTINÉZ et al., 2006), sendo que este efeito negativo do processo de criopreservação nos espermatozoides, pode ser exacerbado pela prévia exposição destes ao processo de sexagem (KLINC; RATH, 2007; BLONDIN et al., 2009).

Apesar das diferenças entre o sêmen não sexado e sexado serem mantidas até às 8 h de incubação, foi observado que após 12 h, a porcentagem de espermatozoides móveis, com motilidade progressiva e vivos com acrossoma íntegro ou reagido, se igualou em ambos os grupos. Entretanto, a porcentagem de espermatozoides com MP estável e desestabilizada e com potencial mitocondrial permaneceu diferente entre os dois grupos, mesmo após as 12 h de incubação. Isto pode ser devido à alta porcentagem de espermatozoides com MP desestabilizada dos espermatozoides sexados, indicando claramente que o processo de sexagem induz o início da capacitação destes espermatozoides. Além disto, é conhecido que após a capacitação, os espermatozoides apresentam padrão de hiperatividade de seu movimento (MORTIMER, 1997), com maior produção e, consequentemente maior consumo de ATP (MÚJICA et al., 1994). Isto pode ser responsável pela menor porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial do grupo XY em relação ao grupo NS. Portanto, mesmo com algumas características espermáticas entre os grupos NS e XY se igualando após as 12 h de incubação, não se pode afirmar que o tempo de viabilidade entre espermatozoide não sexado e sexado seja semelhante, já que algumas características necessárias para manutenção da sobrevivência dos espermatozoides, como a estabilidade de MP, permaneceram diferentes após 12 h de incubação. Além disto, as condições de incubação para manutenção da viabilidade espermática utilizadas para este estudo in vitro, são diferentes das

condições de manutenção da viabilidade in vivo, em que os espermatozoides se ligam as CTU uterina, mantendo sua viabilidade por mais tempo (POLLARD et al., 1991).

Estes resultados relacionados às diferenças na viabilidade dos espermatozoides sexados e não sexados, mesmo após algumas horas, sugerem que o aumento da concentração de espermatozoides na dose inseminante, poderia compensar a menor viabilidade dos espermatozoides sexados, aumentando a sua fertilidade in vivo. Entretanto, DeJarnette et al. (2011), utilizando 2,1 ou 10 x 10^6 espermatozoides por dose de sêmen sexado ou não sexado na IA, observaram que o sêmen não sexado apresentou melhores taxas de concepção do que o sêmen sexado, independente da concentração de espermatozoides utilizado. De acordo com estes autores, a concentração de espermatozoides na dose inseminante pode não ser um fator limitante na taxa de concepção desse sêmen, sendo que outros fatores estariam relacionados ao processo de fecundação in vivo, causando as menores taxas de concepção do sêmen sexado. Um destes fatores poderia ser a capacidade do espermatozoide se ligar às CTU, formando os reservatórios espermáticos.

O reservatório espermático da tuba uterina, além de regular o momento da capacitação (FAZELI et al., 1999; TIENTHAI; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004), ajuda a manter a viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, sincronizando a liberação de espermatozoides férteis com o momento da ovulação (POLLARD et al., 1991). Baseado nisto, levantou-se a hipótese de que as menores taxas de fertilidade in vivo do sêmen sexado (SEIDEL et al., 1999; SARTORI et al., 2004; BODMER et al., 2005; ANDERSSON et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; DERJANETTE et al., 2010; MELLADO et al., 2010; UNDERWOOD et al., 2010a, 2010b; DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011; HEALY; HOUSE; THOMSON, 2013), poderiam estar relacionadas com uma alteração na formação e liberação dos espermatozoides dos reservatórios da tuba uterina. É conhecido que a formação destes reservatórios espermáticos está relacionada com a presença de proteínas e açucares na membrana dos espermatozoides (GREEN et al., 2001; GWATHMEY; IGNOTZ; SUAREZ, 2003; FOYE-JACKSON et al., 2011; KADIRVEL et al., 2012), e que após o processo de capacitação e posterior reação acrossômica, os espermatozoides perdem estas proteínas envolvidas na ligação com às CTU (GWATHMEY; IGNOTZ; SUAREZ, 2003). Portanto, o início da capacitação dos espermatozoides, claramente causada pelo processo de sexagem, poderia gerar alterações na ligação destes com as células da tuba uterina. Para testar esta hipótese, foi avaliado o número de espermatozoides a agregados celulares, após 30 min ou 24 h de co-incubação. Desta forma, foi identificado

pela primeira vez que, apesar das alterações espermáticas causadas pelo processo de sexagem os espermatozoides sexados são capazes de se ligar as CTU.

Embora a metodologia utilizada na maioria dos trabalhos (LEFEBVRE; LO; SUZREZ, 1997; PETRUNKINA et al., 2001; GWATHMEY; IGNORZ; SUAREZ, 2003; KADIRVEL et al., 2012) para realização deste teste de ligação seja uma incubação de 15 a 30 min in vivo, os espermatozoides bovinos podem se manter ligados a estas CTU por muitas horas (DRUAT et al., 2012). Além disto, De Pauw et al. (2002) identificaram correlação positiva entre o número de espermatozoides ligados a agregados de CTU após 24 horas de incubação e taxa de não retorno. Portanto, mesmo que os espermatozoides sexados se liguem as células da tuba, as suas menores taxas de fertilidade in vivo, poderiam estar relacionada a uma menor capacidade destes espermatozoides de se manterem ligados às células da tuba. Por esse motivo, também foi testada a capacidade dos espermatozoides de se manterem ligados até 24 h de incubação. Os resultados mostraram que após este período, havia menos espermatozoides sexados ligados aos agregados. Isto indica, que apesar desses espermatozoides apresentarem capacidade de se ligar às CTU e formar os reservatórios espermáticos, esta ligação não se mantém como observado no sêmen não sexado. Esta diferença entre espermatozoides sexados e não sexados pode estar relacionada com danos celulares, morte dos espermatozoides e/ou a maior porcentagem de espermatozoides capacitando e com acrossoma reagido, que induziriam o desligamento das células tubáricas. Associado a isto, em estudo anterior de nosso grupo (CARVALHO et al., 2013) foi identificado que o processo de sexagem modifica a forma do espermatozoide, com alteração na rugosidade de sua MP, o que também poderia ser causado pela retirada ou modificação de proteínas da MP comprometendo a manutenção da ligação destes espermatozoides aos agregados celulares.

Embora tenha sido identificado um menor número de espermatozoides sexados ligados por mm de agregado após 24 h de incubação, não foi avaliado em que momento começa a ocorrer esta diferença. Portanto, a avaliação em um momento intermediário entre 30 min e 24 h poderia fornecer informações sobre o tempo em que estes espermatozoides permanecem ligados às CTU. Entretanto, como o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de ligação dos espermatozoides essa análise não foi realizada.

Outro aspecto a ser considerado, é que a ligação dos espermatozoides às CTU, pode induzir uma diferenciação na expressão gênica destas células in vivo (FAZELI et al., 2004; KODITHUMAKKU; MIYAMOTO; WIJAYAGUNAWARDANE, 2007; FOYE-JACKSON

et al., 2011) ou in vitro (ALDAMAHI et al., 2012), assim como uma alteração na secreção de proteínas para o interior da tuba (GEORGIOU et al., 2005; 2007). Isto sugere que é preciso uma correta ligação dos espermatozoides às células da tuba durante a formação dos reservatórios espermáticos. Uma alteração na formação deste reservatório, seja na forma ou no tempo de ligação dos espermatozoides, poderia comprometer o ambiente tubárico, e consequentemente, comprometer a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, embora não tenha sido avaliada a real causa do menor número de espermatozoides sexados ligados aos agregados celulares após as 24 h de incubação, isto indica um menor número de espermatozoides viáveis na tuba no momento da ovulação. Além disto, pode não ocorrer uma correta preparação do ambiente da tuba uterina, gerando maior número de ovócitos não fecundados (SARTORI et al., 2004; SHENK et al., 2006; PEIPPO et al., 2009) ou embriões de pior qualidade (SCHENK et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010) quando se utiliza sêmen sexado.

Além da comparação entre espermatozoide sexado e não sexado, também foi testado se há diferença entre espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y na viabilidade em meio de cultivo e na capacidade de ligação às CTU. Muitos estudos não identificaram diferenças entre espermatozoides contendo cromossomo X ou Y, tanto nas características espermáticas quanto para capacidade de fecundação (MORTON et al., 2007; BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Entretanto, no presente estudo, foi identificado que entre 0 e 4 h de incubação, o grupo X apresentou maior porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma reagido, sugerindo menor longevidade dos espermatozoides X em relação ao Y. Isto foi comprovado por Van Dik; Mahony e Hodgen, (2001) que identificaram menor quantidade de espermatozoides contendo cromossomo X ligados à hemi zona pelúcida após 48 h de incubação com os espermatozoides X ou Y. Além disto, esta diferença na porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma reagido encontrada entre espermatozoides X ou Y, pode ser responsável pelo maior número de espermatozoides Y ligados aos agregados celulares após 30 min de incubação. Também foi identificado que espermatozoides do grupo X, apresentaram maior porcentagem com potencial mitocondrial e motilidade progressiva logo após a lavagem em relação aos espermatozoides Y. Embora em estudo anterior nós não tenhamos identificado diferenças no padrão de motilidade entre espermatozoides X ou Y (CARVALHO et al., 2009). Penfold et al. (1998) identificaram diferença no movimento de linearidade e retilinearidade entre espermatozoides X ou Y. De fato, a retilinearidade do movimento espermático está

diretamente relacionada com a motilidade progressiva, o que juntamente com a diferença na porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial, podem ser responsáveis pela maior motilidade progressiva dos espermatozoides contendo cromossomo X. Estes resultados sugerem que realmente há diferença no padrão de motilidade entre espermatozoides contendo cromossomo X ou Y, e que essa diferença afeta a ligação dos espermatozoides às CTU (PACEY et al., 1995). Além disto, diferenças na foram dos espermatozoides X e Y observados em microscopia de força atômica foram atribuídas a alterações nas proteínas da membrana plasmática (CARVALHO et al., 2013). Estas proteínas, assim como as diferenças no movimento espermático e na integridade acrossomal entre espermatozoide X e Y, poderiam estar relacionadas com a diferença na capacidade de ligação desses espermatozoides às CTU.

4.5 Conclusão

Conclui-se que o processo de sexagem por citometria de fluxo afeta características estruturais da célula espermática, induzindo os espermatozoides à uma capacitação e reação acrossômica, entretanto a queda na qualidade ao longo de 12 h em meio de cultivo, foi semelhante a do sêmen convencional. O processo de sexagem compromete a capacidade dos espermatozoides de se manterem ligados às CTU. Além disto, os espermatozoides X foram mais susceptíveis às alterações acrossomais e as relacionadas à motilidade além de apresentar menor capacidade de se ligar às CTU do que os espermatozoides Y.

Referências

ALDARMAHI, A.; ELLIOTT, S.; RUSSELL, J.; KLONISCH, T.; HOMBACH-KLONISCH, S.; FAZELI, A. Characterisation of an in vitro system to study maternal communication with spermatozoa. **Reproduction Fertilility and Development,** Melbourne, v. 24, p. 988-998, 2012.

ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reproduction Fertility and Development,** Melbourne, v. 18, p. 395-402, 2006.

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

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reproduction,** Madson, v. 79, p. 594-597, 2008.

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,** New York, v. 71, p. 30-38, 2009.

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

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; LEMES, A.P.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. 2009. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 44, p. 1346-1351, 2009.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURAO, G.B.; DODE, M.A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology,** New York, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

CARVALHO, J.O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; SARTORI, R.; RODRIGUES, F.C.; BRAVIM, O.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development,** New York, v. 79, p. 77-84, 2012.

CARVALHO, J.O.; SILVA, L.P.; SARTORI, R.; DODE, M.A. Nanoscale differences in the shape and size of x and y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. **PLoS One,** San Francisco, v. 8, p. e59387, 2013.

CHEUQUEMAN, C.; BRAVO, P.; TREULEN, F.; GIOJALAS, L.; VILLEGAS, J.; SANCHEZ, R.; RISOPATRON, J. Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals,** Berlin, v. 47, p. 39-43, 2012.

CHOI, Y.H.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SEIDEL, G.E.JR.; SQUIRES, E.L. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 2080-2087, 2003.

DE PAUW, I.M.; VAN SOOM, A.; LAEVENS, H.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. Sperm binding to epithelial oviduct explants in bulls with different nonreturn rates investigated with a new in vitro model. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 67, p. 1073-1079, 2002.

DEJARNETTE, J.M.; LEACH, M.A.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MCCLEARY, C.R.; MORENO, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 94, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J.M.; MCCLEARY, C.R.; LEACH, M.A.; MORENO, J.F.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 93, p. 4079-4085, 2010.

DRUART, X. Sperm interaction with the female reproductive tract. **Reproduction in Domestic Animals,** Berlin, v. 47, p. 348-352, 2012.

FAZELI, A.; AFFARA, N.A.; HUBANK, M.; HOLT, W.V. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 71, p. 60-65, 2004.

FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 60, p. 879-886, 1999.

FOYE-JACKSON, O.T.; LONG, J.A.; BAKST, M.R.; BLOMBERG, L.A.; AKUFFO, V.G.; SILVA, M.V.; GUTHRIE, H.D.; MCMURTRY, J.P. Oviductal expression of avidin, avidin-related protein-2, and progesterone receptor in turkey hens in relation to sperm storage: effects of oviduct tissue type, sperm presence, and turkey line. **Poultry Science,** Champaign, v. 90, p. 1539-1547, 2011.

GEORGIOU, A.S.; SNIJDERS, A.P.; SOSTARIC, E.; AFLATOONIAN, R.; VAZQUEZ, J.L.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; WRIGHT, P.C.; FAZELI, A. Modulation of the oviductal environment by gametes. **Jounal of Proteome Research**, Washington, v. 6, p. 4656-4666, 2007.

GEORGIOU, A.S.; SOSTARIC, E.; WONG, C.H.; SNIJDERS, A.P.; WRIGHT, P.C.; MOORE, H.D.; FAZELI, A. Gametes alter the oviductal secretory proteome. **Molecular & Cellular Proteomics,** Bethesda, v. 4, p. 1785-1796. 2005.

GREEN, C.E.; BREDL, J.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F.; FAZELI, A. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. **Reproduction,** Cambridge, v. 122, p. 305-315, 2001.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 69, p. 809-815, 2003.

HEALY, A.A.; HOUSE, J.K.; THOMSON, P.C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Jounal Dairy Science,** Champaign, v. 96, p. 1905-1914, 2013.

KADIRVEL, G.; MACHADO, S.A.; KORNELI, C.; COLLINS, E.; MILLER, P.; BESS, K.N.; AOKI, K.; TIEMEYER, M.; BOVIN, N.; MILLER, D.J. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 87, p. 147, 2012.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals,** Berlin, v. 42, p. 63-67, 2007.

KODITHUWAKKU, S.P.; MIYAMOTO, A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P. Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. **Reproduction,** Cambridge, v. 133, p. 1087-1094, 2007.

LARSON, J.E.; LAMB, G.C.; FUNNELL, B.J.; BIRD, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J.C. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-

sorted or conventional, frozen-thawed semen. **Theriogenology,** New York, v. 73, p. 698-703, 2010.

LEFEBVRE, R.; LO, M.C.; SUAREZ, S.S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 56, p. 1198-1204, 1997.

MARTINEZ, C.O.; JUAREZ-MOSQUEDA, M.D.E.L.; HERNANDEZ, J.; VALENCIA, J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. **Theriogenology,** New York, v. 66, p. 1969-1975, 2006.

MELLADO, M.; CORONEL, F.; ESTRADA, A.; RIOS, F.G. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. **Tropical Animal Health Production,** Edinburgh, v. 42, p. 1493-1496, 2010.

MOCE, 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,** New York, v. 66, p. 929-936, 2006.

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

MORTON, K.M.; CATT, S.L.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. The effect of gamete co-incubation time during in vitro fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of in vitro matured adult and prepubertal ewe oocytes. **Theriogenology,** New York, v. 64, p.363-377, 2005.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.; 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,** New York, v. 74, p. 931-940, 2007.

MUJICA, A.; NERI-BAZAN, L.; TASH, J.S.; URIBE, S. Mechanism for procaine-mediated hyperactivated motility in guinea pig spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development,** New York, v. 38, p. 285-292, 1994.

PACEY, A.A.; HILL, C.J.; SCUDAMORE, I.W.; WARREN, M.A.; BARRATT, C.L.; COOKE, I.D. The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. **Humam Reproduction,** Oxford, v. 10, p. 360-366, 1995.

PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMULLER, C.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. **Anatomia, Histologia Embryologia,** Berlin, v. 37, p. 67-73, 2008.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RATY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMAKI, H.; SAIRANEN, A.; MAKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 111, p. 80-92, 2009.

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,** New York, v. 50, p. 323-327, 1998.

PETRUNKINA, A.M.; GEHLHAAR, R.; DROMMER, W.; WABERSKI, D.; TOPFER-PETERSEN, E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. **Reproduction,** Cambridge, v. 121, p. 889-896, 2001.

POLLARD, J.W.; PLANTE, C.; KING, W.A.; HANSEN, P.J.; BETTERIDGE, K.J.; SUAREZ, S.S. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. **Biology of Reproduction,** Madson, v. 44, p. 102-107, 1991.

VILLAMIL, R.P.; WEI, H.; MOREIRA, G.; CACCIA, M.; FERNANDEZ TARANCO, M.; BO, G.A. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology,** New York, v. 78, p. 165-171, 2012.

SALES, J.N.; NEVES, K.A.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SA FILHO, M.F.; BARUSELLI. P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology,** New York, v. 76, p. 427-435, 2011.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; 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,** Belo Horizonte, v. 1, p. 86-90, 2004.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL, G.E.JR. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology,** New York, v. 65, p. 299-307, 2006.

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

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

TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 80, p. 131-146, 2004.

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

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE. R.; MAXWELL. W.M.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science,** Amsterdan, v. 118, p. 171-175, 2010b.

VAN DYK, Q.; MAHONY, M.C.; HODGEN, G.D. Differential binding of X- and Y-chromosome-bearing human spermatozoa to zona pellucida in vitro. **Andrologia,** Berlin, v. 33, p. 199-205, 2001.

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

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo fornecem conhecimentos relacionados ao efeito da sexagem na estrutura e fisiologia de espermatozoides bovinos. Além disto, indica diferenças entre espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y.

Embora vários estudos já tenham avaliado o efeito da sexagem em características estruturais e funcionais dos espermatozoides, ainda não foi identificada a real causa da menor fertilidade destes espermatozoides, principalmente quando utilizado in vivo. Portanto, é possível que o processo de sexagem cause alteração nos espermatozoides que ainda não foram estudadas. Uma possível alteração seria danos epigenéticos, como alteração no padrão de metilação do DNA. Embora não tenha sido identificado efeito da sexagem no padrão de metilação dos genes avaliados neste estudo, não se pode afirmar que outras regiões não tenham seu padrão de metilação alterado pelo processo de sexagem. Além disto, deve ser considerado, que alterações epigenéticas podem estar relacionadas não só a alterações do DNA, mas também à modificações de histonas, sendo o conjunto destes dois fatores, o responsável pelo controle epigenético celular. Portanto, uma avaliação de outros genes ou uma nova abordagem que permita uma avaliação de um maior número de genes do espermatozoide sexado, assim como estudos do efeito da sexagem em outros mecanismos epigenéticos, poderia comprovar os resultados deste estudo.

Além disto, o polimorfismo identificado no gene IGF2 e a resistência a desmetilação nas ilhas CpGs 25 e 26 da segunda região controladora de imprinting do gene IGF2R, fornecem indícios de uma diferença epigenética entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Entretanto, são necessários maiores estudos em outras áreas do genoma, para identificação de outras diferenças epigenética entre estas duas subespécies, assim como a identificação da função biológica destas marcas epigenéticas.

Baseado nas informações presentes neste estudo, relacionados à menor viabilidade do sêmen sexado associada a uma alteração na capacidade de se manter ligado as células da tuba uterina, pode ser sugerido que o melhor momento para inseminação artificial (IA) utilizando sêmen sexado, seria próximo ao momento da ovulação. Este atraso no momento da IA pode reduzir o tempo de espera do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, garantindo maior número de espermatozoides sexados viáveis e ligados às células da tuba uterina no momento da ovulação, tendo aumento no número de ovócitos fecundados e nas taxas de prenhez. Entretanto, são necessários estudos para identificar em que momento os espermatozoides

começam a se desligar das células da tuba uterina. Da mesma forma é necessário avaliar se o efeito da sexagem neste desligamento está relacionado à morte dos espermatozoides ou a outras alterações, tais como a retirada de proteínas envolvidas na ligação destes espermatozoides as células da tuba uterina. Caso esteja relacionado à modificação ou perda das proteínas, uma alternativa seria a adição de plasma seminal ou mesmo de extrato de proteínas relacionadas a esta ligação, o que poderia reestabelecer a capacidade dos espermatozoides de se manterem ligados a estas células. Outro aspecto que deve ser avaliado é se realmente há um efeito da ligação ou do tempo de ligação na formação do ambiente da tuba uterina comprometendo o desenvolvimento embrionário inicial. Se o processo de sexagem altera esta ligação, afetando o ambiente tubárico, isto poderia comprometer o desenvolvimento embrionário inicial, sendo um dos responsáveis pela pior qualidade dos embriões produzidos com espermatozoide sexado.

Em relação aos resultados obtidos na comparação dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y, foram identificadas diferenças na forma destes espermatozoides, possibilitando a identificação destes dois grupos distintos. Embora devido à necessidade de fixação da amostra e tempo de aquisição das imagens, ainda não seja possível à aplicação deste conhecimento em um novo método de sexagem espermática, o surgimento de outras áreas da ciência, como a nanotecnologia, podem utilizar a diferença encontrada entre espermatozoides X e Y deste estudo, para o desenvolvimento de novas metodologias de sexagem.

Além disto, a diferença entre espermatozoides X e Y relacionadas à motilidade e integridade acrossomal indicam maior sensibilidade do espermatozoide X às alterações. Entretanto, são necessários mais estudos relacionados a esta possível diferença entre espermatozoides X e Y, assim como estudos mais precisos do padrão de motilidade destes espermatozoides, tais como avaliação de diferentes subpopulações de movimento espermático definidas por características específicas de movimento. Este conhecimento poderia ser utilizado na identificação de subpopulações funcionalmente diferentes dentro de uma amostra contendo espermatozoides X ou Y, assim como poderia ser correlacionado com o processo de ligação e liberação destes espermatozoides a partir das células da tuba uterina.

Desta forma, apesar dos muitos trabalhos avaliando o efeito da sexagem em diferentes características espermáticas, estudos relacionados às alterações estruturais e funcionais destes espermatozoides sexados, ainda são necessários. Além disto, os resultados apresentados neste

estudo indicam uma diferença estrutural e fisiológica entre espermatozoides X e Y, dando subsídios para novos estudos relacionados a estas diferenças, ou mesmo para o desenvolvimento de novas metodologias para a sexagem espermática.

ANEXOS

A Solução para avaliação de integridade acrossomal em microscópio de fluorecência

A.1 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução I

- IP.....10 mg
- Solução salina 0,9%.....20 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20 °C protegido da luz

A.2 Solução estoque de PNA – Solução II

- PNA .....1 mg
- Tampão Fosfato (PBS).....1 mL

Obs: - aliquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20 °C protegido da luz

A.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 40%.....4 mL
- Solução salina 0,9%.....96 mL

A.4 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio .....3 g
- Solução salina 0,9%.....100 mL

D.4 Solução de trabalho de PNA

- Solução I.....5 µL
- Solução II.....10 µL
- Solução III.....5 µL
- Solução IV.....480 µL

Obs: Preparar a solução de trabalho no dia de uso, mantendo protegido da luz

B. *Setup* do Hamilton Thorne Biosciences (IVOS-Ultimate 12)

- Captura de imagens

  Número de imagens adquiridas por campo.....30

  Taxa de aquisição das imagens.....60 Hz

- Detecção da célula

  Contraste mínimo da célula 80

  Tamanho mínimo da célula.....5 pix

- Células progressivas

  Velocidade de trajeto (VAP)..... 50,0 μm/s

  Retilinearidade (STR).....70%

- Valor de corte VSL para células lentas.....10 μm/s

  Tamanho da célula.....5 pix

  Intensidade da célula.....70

- *Setup* óptico

  Intensidade.....2000 - 220

  Fotômetro.....50-55

- Tipo de câmara.....Makler®
- Temperatura.....37 °C
- Seleção de campos.....Manual

C. Soluções de corantes utilizadas para avaliação dos espermatozoides em citometria de fluxo

C.1 Solução para avaliação de integridade de membrana acrossomal

- PNA.....100 mg/mL
- IP.....2 mg/mL

C.2 Solução estoque para avaliação de fluidez de membrana plasmática

- Merocianina 540.....1 mM/mL
- Yo-pro-1.....25 µM/mL

C.3 Solução estoque para avaliação de potencial mitocondrial

- Mitotracker green.....1 mol/L
- Yo-pro-1.....25 µM/mL