

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO PROCESSO DE SEXAGEM DE
SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO E
CRIOPRERVAÇÃO SOBRE A MORFOMETRIA DA
CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES E
ESTABILIDADE DE CROMATINA**

Katiana Mello de Oliveira
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO PROCESSO DE SEXAGEM DE
SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO E
CRIOPRERVAÇÃO SOBRE A MORFOMETRIA DA
CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES E
ESTABILIDADE DE CROMATINA**

Katiana Mello de Oliveira

**Orientador: Prof. Dr. Elmo Gomes Diniz
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**

Dissertação apresentada á Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para á obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Produção Animal).

Setembro – 2007
Uberlândia - MG

**A melhor maneira de compreender é fazer. Este trabalho é dedicado a
minha mãe Silvia. Por ter sido minha Faculdade permanente.
Ela é meu melhor exemplo.**

**“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível. ”**

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata

À Goyaike e Goyaike Brasil Agropecuária Ltda, e algumas pessoas pertencentes ao grupo que foram essenciais para que este experimento fosse colocado em prática: Mariano Medina, Martín Panarace e Rossana Vilela Resende Franco, os quais me ofereceram a possibilidade de conciliar a realização de um estudo juntamente com o desempenho do meu trabalho junto à empresa, além do apoio financeiro.

Ao Prof.Dr. Marcelo Emílio Beletti que abriu as portas do seu Laboratório não medindo esforços para que o mesmo fosse desenvolvido e por transmitir seus conhecimentos na orientação desse trabalho.

Ao meu Orientador Prof.Dr. Elmo Gomes Diniz por quem tenho uma profunda admiração como professor e profissional.

Aos graduandos Daniel e Guilherme pela valiosa colaboração no trabalho.

Aos momentos de descontração vividos juntos com meus sobrinhos queridos Gabriela e Pedro Paulo e meus amigos.

Ao meu pai pelas palavras de estímulo nos momentos difíceis

Aos amigos de trabalho que de forma direta ou indireta participaram da realização desse trabalho: Luciana, Marcelo, Felipe, Miriam, Giórgia, Carla, Michele e Emerson

À todos minha admiração, gratidão e respeito

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE ANEXOS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
II.1. Espermatogênese e Condensação do DNA Espermático.....	3
II.2. Alterações na Cromatina Espermática.....	5
II.3. Inseminação artificial e técnicas de seleção de sexo.....	6
II.4. Sexagem de sêmen bovino por citometria de fluxo.....	8
II.5. Criopreservação espermática.....	9
II.6. Avaliação da integridade da cromatina espermática.....	10
II.7. Análise computadorizada de imagens para avaliação espermática.....	13
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
III.1. Local.....	17
III.2. Animais.....	17
III.3. Avaliação seminal.....	17
III.3.1. Motilidade Progressiva.....	17
III.3.2. Concentração espermática do ejaculado.....	18
III.3.3. Morfologia espermática.....	18
III.4. Sêmen convencional.....	18
III.5. Confeção dos esfregaços e sexagem de sêmen por citometria de fluxo.....	19
III.6. Avaliação das amostras pós-descongelamento.....	21
III.6.1. Motilidade Progressiva.....	21
III.6.2. Avaliação da pureza.....	21

III.7. Fixação dos esfregaços e coloração.....	22
III.8. Captura de imagens.....	22
III.9. Análise estatística.....	23
IV. RESULTADOS.....	25
V. DISCUSSÃO.....	33
VI. CONCLUSÕES.....	36
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
VII. ANEXOS.....	58
Anexo 1.....	58
Anexo 2.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micromolar

µm - micrômetro

AT - Azul de Toluidina

CASA - Análise Computorizada do Sêmen

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

DFI - Índice de Fragmentação de DNA

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

FIV - Fertilização *in vitro*

IA - Inseminação Artificial

M - molar

min - minuto

mg - miligrama

mM - milimolar

NRC - National Research Council

p - nível de significância

pH - Concentração de Íons de Hidrogênio

SCSA - Teste Análise da Estrutura de Cromatina

SC1 - Esfregaços de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem

SSEX1 - Esfregaços de sêmen sexado, após a sexagem antes de ser mantido a 4°C

SSEXDESC1 - Esfregaços de sêmen sexado, após a descongelação para avaliação

SCONV1 - Esfregaços de sêmen convencional descongelado para a avaliação

SC2 - Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem para avaliação da estabilidade de cromatina

SSEXDESC2 - sêmen sexado, após a descongelação para avaliação para avaliação da estabilidade de cromatina

S – S - Grupos Dissulfídicos

T - Teste de Tunel

TE - Transferência de Embriões

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Composição do diluente BIOXCELL (IMV, Technologies)

Anexo 2- Curva de congelação utilizada pela TK 3000 (TK - Máquinas de Congelação – Embrião e Sêmen)

EFEITO DO PROCESSO DE SEXAGEM DE SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES E ESTABILIDADE DE CROMATINA

RESUMO - O sêmen sexado bovino tem sido comercialmente avaliado devido ao grande valor econômico da seleção de sexo na pecuária de leite e de corte com uma pureza em torno 90% para o sexo desejado. Porém para seu uso é indispensável o uso da criopreservação. O presente estudo objetivou analisar a estabilidade da cromatina espermática e alterações morfométricas da cabeça de espermatozóides de touros doadores de sêmen, em imagens computadorizadas obtidas de esfregaços corados com azul de toluidina de sêmen *in natura*, sexado, sexado descongelado e convencional descongelado. Foram utilizados foram utilizados 17 ejaculados de 17 touros na confecção dos esfregaços para análise de morfometria da cabeça espermática e 15 ejaculados de 15 touros para análise de estabilidade da cromatina espermática, Foram obtidas 100 imagens digitais de cada esfregaço, as quais foram usadas para segmentar 100 cabeças de espermatozóides de cada esfregaço. A área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura: comprimento (L/C), elipcidade (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL) e simetria antero-posterior (SAP) de todas as cabeças foram determinadas pelo uso de programas desenvolvidos no SCILAB. Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma, e a cromatina espermática foi avaliada quanto a intensidade de compactação e homogeneidade. Baseado nos resultados obtidos, o processo de diluição, coloração e incubação anterior ao processo de separação por citometria de fluxo e a criopreservação influenciou na morfometria das células espermáticas, porém a compactação da cromatina foi afetada pelo processo de sexagem por citometria de fluxo.

PALAVRAS-CHAVES: bovino, cromatina, espermatozóides, morfometria, sêmen sexado

EFFECT OF THE SEXED SEMEN PROCESS THROUGH FLOW CYTOMETRY AND CRYOPRESERVATION ON THE MORPHOMETRY OF SPERMATOZOID HEADS AND CHROMATIN STABILITY

ABSTRACT – Bovine sexed semen has been commercially evaluated due to its great economic value for sex selection in milk and beef cattle raising, with purity around 90% for the desired sex. However, its employment depends on the cryopreservation use. The objective of the present study was to analyze the spermatid chromatin stability and morphometric alterations in spermatozoid heads from semen-donor bulls through computerized images obtained from microscopic slides of *in natura* sexed semen stained with toluidine blue, unfrozen sexed semen and from unfrozen conventional semen. Seventeen ejaculated from 17 bulls were used in the confection the microscopic slides for the morphometric analysis of the spermatid head and 15 ejaculated from 15 bulls were used for the analysis of the spermatid chromatin stability. One hundred digital images were obtained from each slide and were used to segment 100 spermatozoid heads from each slide. Area (A), perimeter (P), width (W), length (L), width/length ratio (W/L), elipcity (E), shape factor (SF), lateral symmetry (LS) and anterior-posterior symmetry (APS) of all heads were determined through the use of softwares developed in the SCILAB. Fourier descriptors with amplitude from 0 to 2 (F0, F1, F2) were also considered for the characterization and analysis of shape, and the spermatid chromatin was evaluated in relation to compaction intensity and homogeneity. Based on results obtained, the dilution, staining and incubation process previous to the separation process through flow cytometry and cryopreservation influenced the morphometry of spermatid cells; however, the chromatic compaction was slightly affected by the sexed process through flow cytometry.

Keywords: bovine, chromatin, spermatozoids, morphometry, sexed semen.

I. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) foi à primeira biotecnologia desenvolvida para aumentar a produção e o ganho genético em sistemas de produção animal. A aceitação da tecnologia de IA forneceu suporte para desenvolvimento de outras tecnologias como criopreservação, sexagem de sêmen, transferência de embriões (TE) e clonagem (FOOTE, 2000).

A separação de espermatozóides bovinos em frações de espermatozóides portadores do cromossomo sexual X e portadores do cromossomo sexual Y têm sido uma biotécnica da reprodução de interesse de cientistas durante décadas (BEAL et al., 1984). Entretanto, Johnson et al. (1987) possibilitaram a separação de espermatozóides portadores de cromossomo X e Y em duas populações, usando citometria de fluxo baseado na quantidade total de DNA celular (US Patent # 5135759) a única metodologia comercial.

Durante a produção do sêmen sexado criopreservado, as células espermáticas são submetidas a processos físicos e químicos: diluição, incubação, coloração, passagem pelo citômetro de fluxo, exposição a laser, pressão, centrifugação e criopreservação. Zhang et al. (2003) relataram que o processo de separação por citometria de fluxo e a coloração do DNA não afetaram o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, entretanto a variações entre touros ao processo de sexagem foram observadas para taxa de clivagem e blastocisto.

Pelo fato das cabeças dos espermatozóides mamíferos serem quase que totalmente constituídas de cromatina, é esperado que alterações nesta estrutura possam seguir-se de alterações morfológicas (FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001a).

Um método frequentemente usado para avaliar o formato da cabeça de espermatozóides é a avaliação subjetiva em espermatozóides normais e anormais (BARTH; OKO, 1989), a qual possui certo grau de subjetividade.

Entretanto, não é incomum encontrar células espermáticas classificadas como normal, porém possuindo cromatina anormal (DOBRINSKI et al., 1994).

Diversos sistemas que utilizam à análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados na avaliação da motilidade (CENTOLA, 1996), morfometria espermática (GRAVANCE et al., 1999) e estabilidade cromatínica de espécies de interesse, na tentativa de se diminuir a subjetividade, falhas do examinador e aumentar a repetibilidade (BELETTI et al., 2005a, b).

O presente trabalho objetivou analisar a estabilidade da cromatina espermática e alterações morfométricas da cabeça de espermatozóides de touros doadores de sêmen, em imagens computadorizadas obtidas de esfregaços corados com azul de toluidina de sêmen *in natura*, sexado, sexado descongelado e convencional descongelado.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1. Espermatogênese e condensação do DNA espermático

A espermatogênese é a transformação biológica do espermatozóide a partir de sua célula primordial a espermatogônia, a qual ocorre em um ciclo de 61 dias em touros. Durante espermatogênese ocorrem dois processos: a espermatocitogênese e a espermiogênese. A espermatocitogênese ocorre aproximadamente em 44 dias e inclui divisões mitóticas e meióticas de espermatogônias para espermatócitos primários e secundários, e eventualmente para formar espermátides (ACEVEDO, 2001). A espermiogênese requer adicionalmente 17 dias para transformação morfológica e formação de espermátide em espermatozóide alongado e maduro (JOHNSON et al., 1994).

Durante a espermiogênese, os núcleos espermáticos são reorganizados e o DNA (ácido desoxirribonucléico) é condensado. O espermatozóide maduro é compacto e estável resultando em uma estrutura de cromatina bem diferente das encontradas nas células somáticas ativas (WARD, 1997; WARD; COFFEY, 1991). Nos mamíferos, especificamente na espermiogênese as histonas somáticas, proteínas nucleares básicas, e outras proteínas cromossômicas são substituídas totalmente ou em parte por oligopeptídeos ou nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, denominadas protaminas ou proteínas queratinosas, as quais possuem um caráter mais básico, ricas em arginina e cisteína oxidada (UNANIAN, 2000; VILFAN et al., 2004).

O alto grau de compactação da cromatina e estabilidade no espermatozóide do ejaculado é devido a um processo que ocorre na fase final da espermiogênese para espermição e mesmo durante transporte pelo epididímo, os grupos tiol continuam a oxidação resultando em muitos grupos dissulfídico (S-S) (ACEVEDO, 2001). A integridade do DNA espermático é um importante e independente parâmetro de qualidade seminal que tem sido

associado com potencial de fertilidade em biotécnicas da reprodução (LOPES et al., 1998; LARSON-COOK et al., 2003).

Mc Pherson; Longo (1993) em seus experimentos observaram que a presença de pequenas quebras no DNA ou cortes endógenos na cromatina de espermatozoides de ratos ocorrem quando a mesma é drasticamente transformada. Os mesmos propuseram que a DNA topoisomerase II é uma nuclease endógena responsável por criar e ligar cortes durante a espermiogênese, e que estes tem participação durante a condensação do DNA. Porém essas quebras ou cortes endógenos não devem persistir no espermatozoide maduro depois de ejaculado.

De acordo com Balhorn et al., (1991) as moléculas de protaminas são divididas em duas classes, protamina 1 e 2, encontradas em espermatozoides de mamíferos, mas em espermatozoides bovinos encontra-se somente protamina do tipo 1. O processo de substituição de histonas por protaminas é um processo vital para fertilidade espermática, já que a compactação da cromatina é essencial para o funcionamento normal do espermatozoide (KOSOWER et al., 1992). É relatado que em mamíferos, cortes na estrutura cromatínica são provavelmente gerados durante a espermiogênese quando as histonas são substituídas por protaminas, podendo a protaminação não ocorrer de forma correta gerando distúrbios de condensação da cromatina (complexo DNA-proteína) dos espermatozoides e a persistência dessas aberrações no espermatozoide pode interferir no mecanismo normal de reparo (SOTOLONGO et al., 2005) com repercussões sobre a fertilidade (MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1996).

Balhorn (1982) e Prieto et al., (1997) propuseram que as ligações das protaminas no DNA estão situadas ao longo da curvatura menor da dupla hélice da molécula de DNA. Ao se considerar a localização da curvatura, as protaminas contêm grupos de arginina carregados positivamente suficiente para neutralizar os grupos fosfato carregados negativamente na cadeia. Os grupos aminoterminal e carboxiterminal das moléculas de protaminas, em espermatozoides bovinos são pregueados na direção central interna da

molécula e fechados no local, por uma ligação difissulfídica intramolecular (BALHORN et al., 1991).

Sakkas et al. (1995) propuseram que a ligação de cortes ocorrem em evento final na estrutura de cromatina que liberam protaminas para associar e compactar a cromatina espermática. Suas afirmações sugerem que o procedimento de protaminação é completado no espermatozóide na entrada dos ductos eferentes. Portanto, cortes na cromatina não devem estender sobre núcleos normalmente condensados de espermatozóides ejaculados.

II.2. Alterações na cromatina espermática

Apesar dos espermatozóides de touro possuírem somente um tipo de protamina, anormalidades no complexo DNA-protamina podem ser encontradas, já que a baixa condensação da cromatina espermática pode levar a defeitos no DNA (Sailer et al., 1996). A danificação do DNA espermático pode ser explicada por várias hipóteses: condensação imprópria durante a espermatogênese e maturação epididimal do espermatozóide (SAKKAS et al., 1999), estresse oxidativo por elevado número de espécies reativas de oxigênio devido à infecções genitais (MOUSTAFA et al., 2004). Alguns espermatozóides com anormalidades cromatínicas conseguem fecundar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém o defeito no DNA pode persistir durante todo o período embrionário, induzindo á apoptose, fragmentação embrionária (ELLINGTON et al., 1998) e aborto espontâneo no primeiro trimestre de gestação (IBRAHIM et al., 1988). SAILER et al. (1996) em seus estudos, relataram uma baixa taxa de gestação observada em vacas inseminadas com espermatozóides portadores de cromatina anormal.

Fatehi et al. (2006) mediram a taxa de clivagem, formação de blastocisto e a incidência de apoptose embrionária em oócitos utilizados em programas de FIV com espermatozóides irradiados com raios-X e relataram que as células espermáticas irradiadas comparadas com as não irradiadas não perderam a motilidade, integridade de membrana acrossomal e mitocondrial. Entretanto observaram uma significativa relação logarítmica entre a dose de radiação e

danos na cromatina espermática. Aumento na desnaturação do DNA pode estar associado à infertilidade ou subfertilidade (DURAN et al., 1998; BELLETI; MELLO, 1996).

Foram encontradas baixas correlações entre condensação da cromatina e parâmetros utilizados no espermograma de rotina (SPANÓ et al., 1998; ROCHA et al., 1999), o que mostra que testes de condensação de cromatina não estão necessariamente associados com os critérios convencionais, podendo ser método independente de avaliação de qualidade de sêmen (HAMMADEH et al., 1998). Ao contrário, observou-se correlação significativa entre maturidade nuclear e morfologia dos espermatozoides (BALLACHEY et al., 1987; BRITO; MELLO, 1988).

II.3. Inseminação artificial e técnicas de seleção do sexo

A inseminação artificial em bovinos é uma biotecnologia da reprodução de custos mais acessíveis, a qual é utilizada como elemento de ligação entre as inovações biotecnológicas tradicionais e as de ponta, sendo responsável pela estruturação do melhoramento na bovinocultura (HAFEZ, 1995; SILVEIRA; FONSECA, 1998). Todavia, para sua aplicação é indispensável o uso do sêmen congelado, o que torna necessárias análises das células espermáticas quanto à qualidade de membrana e estrutura cromatínica, já que as mesmas estão associadas à fertilidade (PARKS; GRAHAM, 1992).

A difusão das técnicas de inseminação artificial associadas aos programas de melhoramento genético animal, e a necessidade de sistemas de produção com maior eficiência, beneficiaram o desenvolvimento das técnicas de seleção do sexo baseada na separação de espermatozoides portadores de cromossomos X e Y. A seleção do sexo tem grande valor econômico na pecuária de leite e de corte, onde a produtividade dos sistemas é favorecida pela progênie de um dos sexos (HOSSEPIAN, 1998).

Nicholas; Smith (1983) demonstraram que a seleção do sexo é um fator importante no sistema moderno de teste de progênie, efetuado em núcleos de criação. Este sistema usa a transferência de embriões para reduzir o intervalo

entre gerações, aumentar a intensidade de seleção e, conseqüentemente, maximizar o progresso genético.

No início do século XX a determinação do sexo foi atribuída apenas ao cromossomo X, sendo o macho X0 e a fêmea XX, somente em 1914 Bridges descobriu que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X com outro morfologicamente distinto, o cromossomo Y. A teoria usual descreve que o cromossomo Y determina o sexo por indução do desenvolvimento de testículos por um determinado gene, ou conjunto de genes, denominados SRY (SEX DETERMINING REGION), e que na sua ausência há desenvolvimento de estruturas para formação de fêmea (HUNTER, 1995).

A determinação sexual em mamíferos ocorre a partir da fertilização com espermatozóide portador do cromossomo sexual X para desenvolvimento de fêmeas ou portador do cromossomo sexual Y para desenvolvimento de machos, sendo igual à probabilidade de um espermatozóide carregar qualquer destes cromossomos. Durante a espermatogênese ocorrem várias divisões celulares que posteriormente determinam a separação dos cromossomos sexuais X e Y direcionando-os para diferentes espermatozoides (PACE, 1990).

A separação de espermatozoides portadores de cromossomos sexuais X ou Y tem sido o objetivo de vários métodos de seleção em animais domésticos. Algumas características dos espermatozoides têm sido usadas como meios para diferenciar estes gametas, entre elas a velocidade de migração. Ericsson et al. (1973) descreveram que o espermatozóide portador do cromossomo Y é mais rápido, porém Kaneco et al. (1984) analisando a carga de superfície sugeriram que o cromossomo X migra para o catodo e o Y para o anodo. Uma característica também estudada é o tamanho, para Cui; Mattew (1993) o espermatozóide portador do cromossomo X é maior. Outra característica avaliada é a presença do antígeno H-Y existente na superfície do espermatozóide portador do cromossomo Y (WACHTEL, 1983). Porém, Johnson (1995) relatou que a diferença no conteúdo de DNA existente entre os espermatozoides portadores do cromossomo X e Y é uma diferença mensurável e validada, já que o cromossomo X é maior e carrega maior

quantidade de DNA que o cromossomo Y em todos os mamíferos; já os autossomos são idênticos em quantidade de DNA.

II.4. Sexagem de sêmen bovino por citometria de fluxo

O sêmen sexado bovino tem sido comercialmente avaliado desde início desse milênio. A seleção de sexo tem grande valor econômico na pecuária de leite e de corte (FABER et al., 2003). Johnson et al. (1987) possibilitaram a separação de espermatozoides portadores de cromossomo X e Y em duas populações, usando citometria de fluxo baseado na quantidade total de DNA celular. O método desenvolvido mensura a quantidade de DNA individual de cada célula espermática pela fluorescência emitida por um corante que se liga ao DNA, Hoechst 33342, quando os espermatozoides são separados pelo citômetro de fluxo, o mesmo tem sido efetivo na separação, com uma pureza em torno 90% para o sexo desejado (JOHNSON et al., 1999; SEIDEL , 2003).

Primeiramente, a tecnologia de sexagem de sêmen utilizava um citômetro de fluxo convencional criado no início de 1970 e melhorado em 1980, este utilizava um instrumento em forma de agulha responsável por orientar as células espermáticas durante a passagem pelo citômetro de fluxo. Porém com esta metodologia somente 20 a 30% dos espermatozoides poderiam ser orientados (JOHNSON et al., 1999).

O citômetro de fluxo convencional foi modificado para aumentar a acurácia ao medir a quantidade de DNA e diminuir a variabilidade encontrada na orientação causada pela diferença na emissão de fluorescência do perfil ou borda e da face plana do espermatozoide (RENS et al., 1998). O desenvolvimento de um novo instrumento que orientava as cabeças dos espermatozoides para melhor incidência do feixe do laser e o desenvolvimento de um citômetro de fluxo de alta velocidade (MoFlo; Cytomation, Inc. Fort Collins, CO) foram algumas das alterações ocorridas no equipamento.

Durante a produção de sêmen sexado congelado, as células espermáticas são expostas a um número potencial de riscos que podem ocasionar danos em suas membranas e DNA. Entre os possíveis riscos estão incluídos diluição, incubação, exposição do DNA a coloração, elevada pressão com qual a célula passa pelo citômetro de fluxo, exposição ao laser, centrifugação e criopreservação (KRZYZOSIAK et al., 2000), podendo afetar a capacidade de sobrevivência e potencial de fertilização do espermatozóide.

De acordo com Lu et al. (1999); Zhang et al. (2003); Oliveira et al. (2005) o potencial de fertilização do sêmen sexado por citometria de fluxo tem sido demonstrado em fecundação *in vitro* (FIV). Ao utilizar ejaculado de três diferentes touros em experimentos com FIV, foi observado que a sexagem por citometria de fluxo e a coloração do DNA não afeta o desenvolvimento até blastocisto (ZHANG et al., 2003). *In vivo*, poucos estudos têm comparado à fertilidade do sêmen sexado e convencional criopreservados. As taxas de gestação do sêmen sexado criopreservado estão entre 70% - 90% em relação aos controles, porém os resultados são afetados pelo número de espermatozóides por dose inseminante e diferentes estratégias de inseminação (SEIDEL Jr. et al, 1999).

II.5. Criopreservação espermática

A criopreservação de células espermáticas bovinas para o uso em IA é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal (PESCH; HOFMANN, 2007). Este processo é dividido em cinco partes distintas: diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e descongelação. Os passos citados tem uma grande relação com a estrutura funcional das membranas espermáticas e metabolismo celular (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990)

Durante o processo de congelação-descongelação ocorre o decréscimo da população espermática viável devido a danos nas membranas espermáticas, citoesqueleto e núcleo espermático (PARKS; GRAHAN, 1992). De acordo com Bailey et al. (2000), após a criopreservação, os

espermatozóides sobreviventes contêm mais cálcio intracelular que anteriormente ao processo, o que reflete em danos à membrana no mecanismo de permeabilidade seletiva. As alterações celulares ocorridas durante a criopreservação e descongelamento são responsáveis pela redução da fertilidade do sêmen criopreservado em comparação com o sêmen *in natura* (WATSON, 2000; CELEGHINI, 2005).

Stornelli et al. (2005) descreveram que o processo de criopreservação afeta a viabilidade das células espermáticas, pois durante o congelamento e descongelamento os espermatozóides são submetidos a vários ciclos de desidratação e hidratação resultando em uma troca significativa de volume e dimensão da cabeça de espermatozóides humanos (THOMPSON et al., 1994), bovinos (GRAVANCE et al., 1998) e eqüinos (ARRUDA et al., 2002). Os fatores de estresse para célula espermática podem ser representados pelas trocas de temperatura, as exposições à crioprotetores, troca de osmolaridade e ambiente extracelular que afetam negativamente a viabilidade espermática durante o processo de criopreservação.

O processo de criopreservação causa danos nos espermatozóides que podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais. Entre os danos está incluída a condensação anormal da cromatina (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Apesar da importância e da grande aplicação do sêmen congelado na bovinocultura com resultados satisfatórios, há uma necessidade de aprofundamento em estudos relacionados à criopreservação, pois após o mesmo, as células espermáticas apresentam alterações de integridade e ou funcionalidade (HOLT, 2000).

II.6. Avaliação da integridade da cromatina espermática

Gledhill (1966) ao utilizar a reação de Feulgen para avaliar o complexo DNA – proteína anômalo em espermatozóides de touros subfértéis, observou com o auxílio do microscópio de luz ultravioleta variações de intensidade na reação de Feulgen, essas são conseqüências da alteração da cinética

hidrolítica do DNA. Este fenômeno, em geral, é causado por alterações no complexo DNA-protamina, tornando a cromatina mais sensível à hidrólise.

A análise de estrutura de cromatina (SCSA) é um teste amplamente usado para avaliar a integridade da cromatina espermática (EVENSON et al., 1980) no sêmen fresco, resfriado ou congelado. No referido teste os espermatozoides são expostos a tratamento ácido e corados com laranja de acridina, um corante metacromático. Os espermatozoides portadores de DNA que desnaturaram durante o tratamento ácido, aqueles portadores de anomalias na compactação, fluorescem com a cor vermelha enquanto os intactos, fluorescem com a cor verde. A proporção de espermatozoides intactos e não intactos são monitorados por um citômetro de fluxo (EVENSON et al., 2002). A proporção de células anormais é chamada de índice de fragmentação de DNA (DFI). O teste SCSA prediz a infertilidade quando o DFI é maior que 30% para concepção natural (EVENSON et al., 1999; SPANO et al., 2000) e 27% para FIV (LARSON-COOK et al., 2003), porém o método utiliza o citômetro de fluxo, o que torna análises científicas e clínicas limitadas devido custo do equipamento e sua manutenção.

A avaliação de danos no DNA espermático pode ser realizada com diferentes testes como o ensaio Cometa (MCKELVEY-MARTIN et al., 1997), a técnica de Tunel (GORCYZA et al., 1993; MARTINS et al., 2007), esfregaços corados com azul de anilina (HAMMADEH et al., 2001; ERENPREISS et al., 2001; HAMMADEH et al., 1996), alaranjado de acridina (TEJADA et al., 1984) e azul de toluidina (MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1996; ERENPREISS et al., 2004).

A integridade de DNA de sêmen sexado bovino foi avaliada por análise da estrutura da cromatina (SCSA). O método foi eficiente na análise da cromatina espermática sexada (GRY et al., 2005). Entretanto, o trabalho usou SCSA, uma técnica que se baseia na avaliação da fluorescência emitida por espermatozoides corados com alaranjado de acridina, por citometria de fluxo, o que não permite a avaliação morfométrica concomitante com a avaliação de cromatina em esfregaços de sêmen.

Um método desenvolvido por Mello (1982) para a avaliação da cromatina espermática utiliza um clássico corante nuclear (catiônico) o azul de toluidina, que exibe fenômeno metacromático e ortocromático, cuja alteração na cor é induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante. A coloração ortocromática (verde - azul) ocorre devido à baixa acessibilidade aos sítios de ligação na cromatina. Essa situação corresponde aos espermatozoides maduros que possuem a cromatina altamente compactada, maioria dos grupos fosfatos bloqueados por protaminas, e conseqüentemente, poucas moléculas do corante se ligariam ao DNA, resultando em uma coloração de verde a azul claro.

Na coloração metacromática (violeta) as moléculas do corante azul de toluidina são ligadas aos grupos fosfatos ionizados do DNA. O pH 4,0 no qual se encontra o corante azul de toluidina permite que outros sítios (ânions) não sejam ionizados. Para espermatozoides com cromatina pouco compactada, com anomalias na interação DNA – proteínas ocorrem um número maior de ligações com as moléculas do corante, resultando numa coloração de azul escuro. Entretanto, somente um alto grau de alteração no complexo DNA-proteína seria identificado por este método. Para aumentar a sensibilidade deste processo se faz necessário promover uma hidrólise antes da coloração, as amostras devem ser submetidas a um tratamento ácido (HCL 4N a 25^oC, 25 minutos) seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0). Devido à cromatina altamente compactada, espermatozoides normais seriam pouco afetados pela hidrólise e conseqüentemente, se coram em azul claro. Porém em espermatozoides com cromatina com baixo grau de compactação pode ter as protaminas parcialmente extraídas, promovendo assim ligações das moléculas do corante com os grupos fosfatos do DNA (MELLO, 1982).

Erenpreiss et al. (2004) avaliou a integridade do DNA espermático comparando o teste com azul de toluidina (AT), com os testes análise da estrutura da cromatina (SCSA) e o teste Tunnel (T). Amostras espermáticas de 35 homens foram avaliadas pelos parâmetros padrões de qualidade seminal e submetidas aos testes AT e SCSA, e 18 amostras espermáticas foram submetidas ao teste T, concluíram que o teste T é um método fácil e de baixo

custo e de grande potencial para ser usado como teste de rotina para avaliar integridade de DNA espermático, e complementar aos parâmetros de padrões de qualidade seminal (concentração, motilidade e morfologia).

Os defeitos morfológicos de espermatozóides podem influenciar nas propriedades hidro-dinâmicas da célula, como progressão normal retilínea e uniforme do espermatozóide. A morfologia de cabeça de espermatozóides é de modo geral um nível organizacional, um reflexo da estrutura de cromatina que pode ser importante para fertilidade. Cabeças de espermatozóides bovinos deformadas de touros subfértéis foram citadas por conter estrutura de cromatina anormal (MCCOSKER,1969; GLEDHILL,1971a), provavelmente um resultado da condensação anormal da cromatina (GLEDHILL, 1971b). A susceptibilidade do DNA nuclear espermático para desnaturação é inversamente relacionado com a organização cromatínica, a morfologia espermática normal e a viabilidade espermática (BALLACHEY et al.,1987; BALLACHEY et al.,1988; KARABINUS et al. ,1990).

II.7. Análise computadorizada de imagens para avaliação espermática

Na avaliação seminal, a principal técnica de eleição é a análise visual do examinador, a qual possui certo grau de subjetividade (OMBELET et al.,1997; FERRARI et al.,1998;) torna-se importante relatar que uma avaliação subjetiva das características seminais tem variações consideráveis entre técnicos laboratoriais e laboratórios (SAACKE, 1982; BAKER ;CLARKE, 1987). Diversos observadores podem classificar amostras de um mesmo ejaculado diferentemente, dependendo de suas interpretações de morfologia normal e anormal (DUNPHY et al., 1989).

Na tentativa de se diminuir a subjetividade e aumentar a repetibilidade entre examinadores e precisão das análises, foram propostos o uso da análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade e diferenças nas dimensões da cabeça de espermatozóides de diferentes espécies (BUENDÍA et al., 2002; HIDALGO, 2004; RODRÍGUEZ et al., 2004).

Motilidade, concentração e morfologia espermática são parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen fresco, resfriado, congelado e sexado (ARRUDA et al., 2007). Muitos sistemas computadorizados como o “CASA” (computer-aided sêmen analysis - Hamilton Thorne Biosciences, Inc., Beverly, Massachusetts, U.S.A) e SQA (sperm quality analyzer - Medical Electronic Systems Ltd., Caesarea, Israel) são usados na avaliação espermática, dentre os parâmetros avaliados, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, resultados de fertilização *in vitro* e penetração em oócitos de hamster (CENTOLA, 1996). O “CASA” permite a avaliar a concentração, porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea, velocidade linear, velocidade média e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (WIJCHMAN et al., 2001). Esse tipo de teste promove uma avaliação precisa e acurada dos espermatozoides, com alto grau de objetividade, permitindo o aprimoramento do processo de avaliação seminal (ARRUDA, 2000).

Mensurações básicas como perímetro, área, comprimento, largura, e fatores derivados destas medidas são parâmetros avaliados na análise computacional da morfologia espermática (GARRETT; BAKER, 1995). Em adição a estas mensurações básicas, descritores Fourier que caracterizam a forma da cabeça espermática utilizando amplitudes harmônicas de Fourier também são usados (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b). O perímetro de curvatura da cabeça espermática pode ser explicado por funções Fourier, a qual utiliza amplitudes harmônicas para determinar parâmetros multivariados que descrevem o formato do núcleo espermático de touros que diferem em fertilidade (OSTERMEIER et al., 2001a).

Em seus experimentos (OSTERMEIER et al., 2001a) investigaram a relação entre fertilidade em touros doadores de sêmen com o formato nuclear espermático, utilizando descritores Fourier e concluíram que amplitudes harmônicas de Fourier podem avaliar pequenas diferenças no formato nuclear do espermatozoide.

A avaliação morfométrica dos espermatozoides também tem sido usada para demonstrar que a criopreservação afeta as dimensões da cabeça de

espermatozóides de touros (GRAVANCE et al., 1998), eqüinos (ARRUDA et al., 2002), caninos (NÚÑEZ – MARTINEZ et al., 2007), com menores valores encontrados nas amostras após criopreservação. Outra aplicação para análise de imagem é a caracterização da cromatina de espermatozóides corados com azul de toluidina, que pode concomitantemente ser usada com a análise morfométrica (BELETTI et al., 2005a, b).

Ao contrário da motilidade, as morfologias normal e anômala dos espermatozóides variam para cada espécie e se faz necessário uma padronização da técnica para diferentes espécies. A análise da morfologia espermática é um importante indicador de baixa fertilidade em homens (KRUGER et al., 1993), eqüinos (JASKO et al., 1990) e bovinos (SEKONI; GUSTAFSSON, 1987). A maioria das técnicas até agora padronizadas para determinar alterações morfológicas de espermatozóides são restritas à análise morfométrica da cabeça de espermatozóides, sendo mensuradas apenas a área, perímetro, comprimento, largura e razão largura/altura (JAGOE et al., 1986; KATZ et al., 1986; SCHRADER et al., 1990; DAVIS et al., 1992; MACLEOD; IRVINE, 1995;). Porém recentemente, a avaliação de outros parâmetros morfológicos da cabeça (GARRETT; BAKER, 1995; HARR, 1997) e até mesmo da cauda (GERGELY et al., 1999; STEIGERWALD; KRAUSE, 1998) estão sendo pesquisados.

A análise de imagem, como técnica para avaliação de sêmen, tem sido usada em diferentes espécies, tal como bovino (SAILER et al., 1996; GRAVANCE et al., 1998a; GRAVANCE et al., 1999), ovino (SANCHO et al., 1998), suíno (HIRAI et al., 2001; KONDRACKI et al., 2005), eqüino (DAVIS et al., 1992; GRAVANCE et al., 1996; GRAVANCE et al., 1997; ARRUDA et al., 2002), coelho (GRAVANCE; DAVIS, 1995) e rato (HIGUCHI et al., 2001).

Beletti et al., 2005a em seus experimentos investigou a correlação entre aspecto morfométrico da cabeça de espermatozóides bovinos e anormalidades na condensação de cromatina usando análise de imagens computadorizadas de esfregaços de sêmen bovino corados com azul de toluidina. Os autores observaram que anormalidades na condensação de cromatina influenciaram na morfologia de cabeça de espermatozóides de diferentes formas. Sailer et al.

(1996) relatam a correlação entre anomalias na cromatina espermática e parâmetros morfométricos em espermatozoides bovinos, entretanto sugeriram que espermatozoides com DNA danificado podem ser considerados morfologicamente normais e capazes de fertilizar um oócito (LOPES et al., 1998).

Novos métodos de avaliação morfométrica da cabeça de espermatozoides vêm sendo desenvolvidos. Estes métodos combinam avaliações matemáticas precisas do formato da cabeça do espermatozoide e da intensidade da compactação da cromatina a partir de imagens obtidas de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina (SILVA, 2006; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005b). Com a utilização dos mesmos pode-se identificar alterações morfológicas e de cromatina não percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005 b).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Local

As coletas das amostras para análise foram realizadas no Laboratório de Sexagem de Sêmen Bovino da Goyaike Brasil Agropecuária Ltda na unidade de Uberaba – MG (Brasil). As análises dos esfregaços foram realizadas no Laboratório de Técnicas Histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

III.2. Animais

Utilizaram-se, nesse estudo, dezessete animais das raças Guzerá, Holandês, Gir leiteiro, Nelore mocho e Girolando pertencentes a central ABS PECPLAN. Os animais foram mantidos em pastagem de capim *Braquiária* (*Brachiaria decumbens*, Stapf), recebendo além de água e sal mineral *ad libitum*, alimentação concentrada diária, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2001) para a categoria de reprodutores, em sistema de produção regular de sêmen coletado por auxílio de vagina artificial. Os mesmos eram pesados quinzenalmente e realizados os controles de ecto e endoparasitas regularmente.

III.3. Avaliação seminal

III.3.1. Motilidade Progressiva

As amostras de sêmen colhidas foram avaliadas em lâminas pré-aquecidas, em aumento de 20X vezes em microscopia de luz (Coleman) com utilização apenas dos ejaculados que apresentaram motilidade progressiva ($\geq 60\%$) e vigor 3, numa escala de 0 a 5. Às amostras colhidas foram adicionados em cada mililitro, misturas de gentamicina (250 μg), tilosina (50 μg), lincomicina (150 μg), e espectinomicina (300 μg).

III.3.2. Concentração espermática do ejaculado

A concentração do sêmen foi medida com auxílio de um espectrofotômetro Fentom utilizando 50 microlitros do sêmen e 3950 microlitros de citrato de sódio. Foram utilizadas concentrações maiores que 1×10^6 espermatozóides/ mL.

III.3.3. Morfologia espermática

Para avaliação morfológica foi utilizado microscópio de contraste de fase. Realizou-se uma diluição colocando-se 290 microlitros de solução formol salina e 10 microlitros de sêmen, fator de diluição 30. Após homogenização, foi realizada a preparação úmida, e os espermatozóides contados em aumento de 100 X. Os defeitos dos mesmos foram classificados em maiores, menores e totais, conforme Blom (1973), somente utilizando-se amostras com morfologia de no mínimo 75% espermatozóides normais.

III.4. Sêmen convencional

A parte do ejaculado destinada ao congelamento de sêmen convencional uma vez passada pela análise da concentração espermática foram distribuídos em tubos contendo diluidor Bioxcell (IMV, Technologies – anexo 1). A concentração das palhetas de sêmen convencional foi ajustada de acordo com o histórico reprodutivo do animal com a concentração mínima 30×10^6 espermatozóides/ mL. Após diluir o sêmen com o crioprotetor, as mesmas foram envasadas em palhetas francesas 0,5 mL (IMV) vedadas com álcool polivinílico (SIGMA) e submetidas à técnica de criopreservação automatizada em congeladora TK 3000 (TK) , seguindo a curva de congelamento utilizada pela central de coleta de sêmen (Anexo 2), e armazenadas em botijões de nitrogênio líquido.

III.5. Confeção dos esfregaços e sexagem de sêmen por citometria de fluxo

Foram realizados quatro tratamentos dos esfregaços confeccionados com os 17 ejaculados em suas diferentes partes do processamento para análise morfométrica. Os grupos foram diferenciados pelas seguintes siglas:

- Tratamento SC 1: Esfregaços de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem.

- Tratamento SSEX 1: Esfregaços de sêmen sexado, após a sexagem antes de ser mantido a 4^oC.

- Tratamento SSEXDESC1: Esfregaços de sêmen sexado, após a descongelação para avaliação.

- Tratamento SCONV1: esfregaços de sêmen convencional descongelado para a avaliação.

Utilizou-se o sêmen recém aprovado *in natura* para confeção dos esfregaços (SC1) e parte do ejaculado para preparo das palhetas de sêmen convencional e sêmen sexado. A parte do ejaculado destinada a sexagem por citometria de fluxo, foi mantida em sala climatizada 18^oC e utilizado durante 9 horas após coletado. As palhetas de sêmen sexado foram criopreservadas com concentração igual à 3x10⁶ espermatozóides por palheta de 0,25 mL.

Posteriormente de acordo com a concentração do ejaculado destinado a sexagem, uma alíquota de sêmen foi diluído com um meio de cultura tamponado (Hepes 40mM, cloreto de sódio 95mM, cloreto de potássio 3mM, fosfato de sódio 0.3mM, bicarbonato de sódio 10mM, cloreto de magnésio 0.4mM, piruvato de sódio 2mM, glucose 5mM, ácido láctico 25mM e pH=7,4), adicionou-se à amostra com uma concentração final de 200 x 10⁶ espermatozóides/ mL um corante não citotóxico, reversível Hoechst ® 33342 (SIGMA), que atravessa a membrana celular do espermatozóide e liga-se seletivamente aos pares de base A-T do DNA, durante a incubação em banho-maria (Nova Ética) a 35^oC por 45 minutos. Após o período de incubação, a amostra foi rediluída com o mesmo meio tampão, acrescido de gema de ovo, com um corante específico para os espermatozóides mortos FD & C # 40

(SIGMA) que reduz a fluorescência do primeiro Hoechst ® 33342 (SIGMA). Este método torna o processo mais eficiente, por separar as células vivas, removendo as mortas. A amostra foi filtrada em filtros portadores de membranas 0.22 µm antes de ser sexada. Uma vez preparada, esta foi colocada no citômetro de fluxo (Moflo SX - Dakocytomation ®), onde ocorreu a separação dos espermatozóides portadores do cromossomo X.



Figura 1. Citômetro de fluxo – Moflo SX, Dakocytomation

O processo de separação dos espermatozóides durava 90 minutos, posteriormente a amostra era substituída por outra e assim sucessivamente até completar 9 horas após a colheita do ejaculado. O sêmen sexado era recolhido em tubos e posteriormente refrigerados a 4^oC por 90 minutos. Após a sexagem e antes do armazenamento por no mínimo 90 minutos a 4^oC, fazia-se o esfregaço de cada amostra (SEX).

Em seguida, todos os tubos contendo os espermatozóides separados foram levados a um balcão refrigerado a 4^oC, e o volume dobrado com uma solução contendo glicerol, posteriormente submetidos à centrifugação em

centrífuga CT 6000 R (CIENTEC) durante 20 minutos a 4^oC e 600G. O sobrenadante era descartado e o pellet resuspenso em um meio sintético para congelamento Bioxcell (IMV) contendo glicerol como crioprotetor. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL com concentração de 3X10⁶ espermatozóides totais e congeladas utilizando congeladora computadorizada TK 3000 (TK).

Para análise da intensidade de compactação da cromatina (CCROM) foram realizados 2 tratamentos de esfregaços com 15 ejaculados em cada tratamento. Os tratamentos foram diferenciados pelas seguintes siglas:

- Tratamento SC 2: Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem.

- Tratamento SSEXDESC 2: sêmen sexado, após a descongelação para avaliação.

III.6. Avaliação das amostras pós- descongelação

III.6.1. Motilidade Progressiva

Após o congelamento, uma palheta de cada partida de palhetas de sêmen sexado foi descongelada avaliada quanto à motilidade progressiva (>35%), pureza do sexo escolhido (>85%), concentração e confeccionado esfregaço das amostras (SSEXDESC). Posteriormente as palhetas de sêmen convencional foram descongeladas para avaliação quanto à motilidade progressiva, vigor e concentração segundo exigências do CBRA (1998) e realizados os esfregaços dos mesmos (SCONV1).

III.6.2. Avaliação da pureza

O restante do conteúdo das palhetas de sêmen sexado, após verificada a motilidade, foi rediluído com 1mL (Tris 197 mM, ácido cítrico 55,4 mM e frutose 47,5 mM e pH= 6,8) e novamente corado com Hoechst por 45 minutos à 35^oC. Posteriormente foram sonificados por 3 minutos por um disruptor de células ultra-sônico (UNIQUE) para remover as caudas dos espermatozóides, e

assim melhorar a orientação durante a passagem pelo citômetro de fluxo. As proporções de espermatozóides X foram determinadas por uma curva de modelo matemático. As amostras de cada partida foram liberadas com pureza acima de 85% de espermatozóides portadores do cromossomo X.

III.7. Fixação dos esfregaços e coloração

Todos os esfregaços dos tratamentos SC 1, SSEX 1, SSEXDESC 1 e SCONV 1 confeccionados para análise morfométrica das cabeças espermáticas, e os esfregaços dos tratamentos SC 2, SSEX 2 para análise da intensidade de compactação da cromatina (CCROM) foram fixados em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto, seguido de um banho de etanol 70% por 3 minutos. Após secagem ao ar, os esfregaços foram hidrolisados por 25 minutos, em ácido clorídrico 4N, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi colocada uma gota de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato) pH 4.0 cobrindo-os com lamínula (BELETTI, COSTA, 2003).

III.8. Captura de imagens

Foram obtidas 100 imagens digitalizadas de cada lâmina usando-se microscópio Olympus BX40 (Olympus) com objetiva de 100X (imersão), acoplado a uma câmera Olympus OLY- 200 (Olympus) e conectada a um microcomputador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153.

Em todos os tratamentos para análise morfométrica das cabeças espermáticas e para análise de intensidade de compactação da cromatina, as imagens digitalizadas foram usadas para segmentar 100 cabeças de espermatozóides de cada lâmina (COSTA, CESAR, 2001). Após a segmentação das cabeças, estas foram processadas por programas desenvolvidos em ambiente de programação matemática (SCILAB) com objetivo de se obter a média e desvio padrão dos valores de pixel dentro das cabeças dos espermatozóides de cada imagem.

Para se ter uma referência da coloração normal, foram selecionadas visualmente 6 cabeças de espermatozóides em cada esfregaço. A média dos valores de píxel destas foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozóides (cabeças padrões). Para cada imagem, as diferenças entre os valores de média de cabeças padrões e valores de média de cada cabeça analisada foram determinadas. As diferenças foram transformadas em porcentagem (Dif%) do valor de média de cabeça padronizada. O coeficiente de variação (CV) dos níveis de cinza foi calculado (BELETTI et al, 2005b, SILVA, 2006).

A área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura: comprimento (L/C), elipcidade (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL) e simetria antero-posterior (SAP) de todas as cabeças foram determinados pelo uso de programas desenvolvidos no SCILAB (BELETTI et al, 2005a, b). Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma conforme descrito por (BELETTI et al, 2003). A simetria da cabeça espermática também foi considerada. A simetria lateral (SL) foi medida para identificação de assimetria ao longo do eixo principal do espermatozóide, que pode implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula. A mensuração da simetria antero-posterior (SAP) foi considerada para identificação de assimetrias ao longo do segundo eixo espermático. As simetrias consideradas foram calculadas pelo procedimento descrito por Beletti ; Costa (2003), que envolve “dobramento” ao longo do eixo maior (ou menor) e identificação da área de sobreposição entre as áreas original e dobrada conforme Costa; César (2001).

III.9. Análise estatística

A análise estatística considerou-se quatro grupos tratamentos SC 1, SSEX 1, SSEXDESC1 e SCONV1 e avaliou-se os resultados obtidos comparando-se dois a dois quanto as variáveis morfométricas área, perímetro, largura, comprimento, largura/comprimento, esfericidade, fator forma, F0, F1, F2, simetria lateral e simetria antero posterior, na cabeça de células

espermáticas do grupos em questão. Nesta análise estatística utilizou-se o software SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) e para verificar a aderência a distribuição normal ou não normal foi usada à análise do Índice de Curtose (IC). Após identificação como uma distribuição não normal, foi aplicado o Teste de Wilcoxon (SIEGEL, 1975) com nível de significância estabelecido em 0,05 em uma prova bilateral.

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais com os grupos tratamento SC2 e SSEXDESC2, quanto à compactação de cromatina, foram testados para verificar a distribuição normal dos mesmos, e posteriormente analisados pelo o software SPLUS (Mathsoft. Inc, 2000). Para verificar a aderência a distribuição normal ou não normal foi usada à análise do Índice de Curtose (IC). Após identificação como uma distribuição normal, foi aplicado o Teste teste t de Student com nível de significância estabelecido em 0,05.

IV. RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados os valores de motilidade, vigor, concentração e volume do sêmen *in natura* (SC1) e motilidade e vigor do sêmen sexado descongelado (SSEXDESC1) e convencional descongelado (SCONV1).

A tabela 2 apresenta valores de motilidade, vigor, concentração e volume do sêmen *in natura* (SC2) e motilidade e vigor do sêmen sexado descongelado (SSEXDESC2) utilizados para avaliação da intensidade de compactação da cromatina espermática (CCROM).

A tabela 3 e tabela 4 respectivamente apresentam os valores de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais de amostras de ejaculados utilizados para confecção dos esfregaços para avaliação morfológica e da intensidade de compactação de cromatina em porcentagem segundo a classificação de Blom, 1973.

Os valores relativos às médias das medidas obtidas na análise morfológica com as variáveis área, perímetro, largura, comprimento, largura/comprimento, esfericidade, fator forma, Fourier 0, Fourier 1, Fourier 2, simetria lateral e simetria antero posterior na comparação entre os tratamentos SC1 e SEX1; SC1 e SSEXDESC1 e dos tratamentos SC1 e SCONV1 estão apresentadas nas Tabelas 5, 7 e 9 respectivamente.

Observa-se nas Tabelas 6, 8 e 10, respectivamente as probabilidades associadas aos valores de t, encontradas quando da aplicação do teste de Wilcoxon aos resultados obtidos com o tratamento SC1 e os demais tratamentos SEX1, SEXDESC1 e SCONV1.

Tabela 1. Valores de motilidade, vigor, concentração para as amostras *in natura* (SC1) e motilidade e vigor para amostras de sêmen sexado descongelado (SSEXDESC1) e convencional descongelado (SCONV1) de touros em coleta de sêmen.

Animal	Raça	AMOSTRAS SC1				AMOSTRAS SSEXDESC1		AMOSTRAS SCONV1	
		Motil (%)	Vigor	Conc (x10 ⁶ sptzs/mL)	Volume (mL)	Motil (%)	Vigor	Motil (%)	Vigor
Touro 1	Holandes	60	4	1380	7	40	3	40	3
Touro 2	Girolando	60	4	1032	6	25	3	45	3
Touro 3	Holandes	65	4	1760	5,5	40	3	50	4
Touro 4	Gir Leiteiro	65	4	1600	11	40	4	35	4
Touro 5	Guzerá	65	4	1212	8	45	4	55	3
Touro 6	Holandes	65	4	2400	10	35	3	40	4
Touro 7	Guzerá	60	4	2000	4	40	4	45	4
Touro 8	Gir Leiteiro	65	4	1500	7,5	40	3	45	3
Touro 9	Nelore	60	4	1500	5,5	30	3	35	3
Touro 10	Gir Leiteiro	60	4	1280	11,5	45	4	45	3
Touro 11	Guzerá	60	3	1350	8,5	40	3	50	4
Touro 12	Girolando	60	4	1420	6	35	3	35	3
Touro 14	Girolando	60	3	1500	6	35	3	35	3
Touro 15	Holandes	60	4	2160	8,5	30	3	50	4
Touro 17	Gir Leiteiro	60	3	1800	10,5	35	4	30	4
Touro 21	Holandes	65	3	2000	6	45	4	35	4
Touro 28	Gir Leiteiro	60	3	1300	7	45	4	55	4

Amostras SC 1: Amostras de sêmen *in natura* utilizadas para confecção de esfregaços logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem/ **Amostras SEXDESC 1:** Sêmen sexado, após a descongelção para avaliação/ **Amostras SCONV1:** Sêmen convencional descongelado para a avaliação

Tabela 2. Valores de motilidade, vigor, concentração para amostras *in natura* (SC2) e motilidade e vigor para amostras de sêmen sexado descongelado (SSEXDESC2) utilizadas para confecção de esfregaços dos respectivos tratamentos para análise da intensidade de compactação da cromatina espermática (CCROM) de touros em regime de coleta de sêmen.

Animais	Raça	GRUPO SC2				GRUPO SSEXDESC2	
		Motil (%)	Vigor	Conc ($\times 10^6$ sptzs/mL)	Volume (mL)	Motil (%)	Vigor
Touro 1	Holandês	60	4	1380	7	40	3
Touro 2	Girolando	60	4	1032	6	25	3
Touro 3	Holandês	65	4	1760	5,5	40	3
Touro 5	Guzerá	65	4	1212	8	45	4
Touro 6	Holandês	65	4	2400	10	35	3
Touro 8	Gir Leiteiro	65	4	1500	7,5	40	3
Touro 9	Nelore	60	4	1500	5,5	30	3
Touro 10	Gir Leiteiro	60	4	1280	11,5	45	4
Touro 12	Girolando	60	4	1420	6	35	3
Touro 14	Girolando	60	3	1500	6	35	3
Touro 15	Girolando	60	4	2160	8,5	30	3
Touro 17	Holandês	60	3	1800	10,5	35	4
Touro 22	Holandês	60	3	1800	10,5	35	4
Touro 30	Holandês	65	3	1000	9,5	45	4
Touro 34	Gir Leiteiro	65	4	1200	6,5	40	4

Amostras SC 2: Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem/ **Amostras SEXDESC 2:** Sêmen sexado, após a descongelação para avaliação.

Tabela 3. Avaliação da morfologia espermática em amostras dos ejaculados utilizados para confecção dos esfregaços para análise morfométrica

Animal	Raça	Def. Maiores %	Def. Menores %	Def. Totais %
Touro 1	Holandês	5	1	6
Touro 2	Girolando	7	5	12
Touro 3	Holandês	3	6	9
Touro 4	Gir Leiteiro	1	6	7
Touro 5	Guzerá	1	0	1
Touro 6	Holandês	7	4	11
Touro 7	Guzerá	1	2	3
Touro 8	Gir Leiteiro	0	3	3
Touro 9	Nelore	0	5	5
Touro 10	Gir Leiteiro	2	5	7
Touro 11	Guzerá	13	6	19
Touro 12	Girolando	2	3	5
Touro 14	Girolando	9	2	11
Touro 15	Holandês	3	2	5
Touro 17	Gir Leiteiro	11	4	15
Touro 21	Holandês	2	2	4
Touro 28	Gir Leiteiro	0	1	1

Def. Maiores (%) = Defeitos Maiores

Def. Menores (%) = Defeitos Menores

Def. Totais (%) = Defeitos Totais

Tabela 4. Avaliação da morfologia espermática em amostras dos ejaculados utilizados para confecção dos esfregaços para análise da intensidade de compactação de cromatina

Animal	Raça	Def. Maiores %	Def. Menores %	Def. Totais %
Touro 1	Holandês	5	1	6
Touro 2	Girolando	7	5	12
Touro 3	Holandês	3	6	9
Touro 5	Guzerá	1	0	1
Touro 6	Holandês	7	4	11
Touro 8	Gir Leiteiro	0	3	3
Touro 9	Nelore	0	5	5
Touro 10	Gir Leiteiro	2	5	7
Touro 12	Girolando	2	3	5
Touro 14	Girolando	9	2	11
Touro 15	Girolando	3	2	5
Touro 17	Holandês	11	4	15
Touro 22	Holandês	8	1	9
Touro 30	Holandês	10	1	11
Touro 34	Gir Leiteiro	2	1	3

Def. Maiores (%) = Defeitos Maiores

Def. Menores (%) = Defeitos Menores

Def. Totais (%) = Defeitos Totais

Tabela 5. Médias dos parâmetros morfométricos de cabeças espermáticas de sêmen *in natura* (SC1) e sêmen sexado (SSEX 1).

	Tratamento SC1	Tratamento SSEX1
	Média	Média
Área (μm^2)	30,28 ^a	31,94 ^b
Perímetro (μm)	23,45 ^a	24,11 ^b
Largura (μm)	4,54 ^a	4,67 ^b
Comprimento (μm)	8,50 ^a	8,68 ^b
Largura/ Comprimento	0,54 ^a	0,54 ^a
Esfericidade	0,30 ^a	0,30 ^a
Fator Forma	1,01 ^a	1,02 ^a
F0	1493,06 ^a	1554,22 ^b
F1	208,77 ^a	207,59 ^a
F2	109,98 ^a	121,07 ^b
Simetria Lateral	0,96 ^a	0,90 ^b
Simetria Antero Posterior	0,90 ^a	0,90 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)

SC1- Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem.

SSEX1 –Esfregaço sêmen sexado, confeccionado após a sexagem antes de ser mantido a 4°C.

Tabela 6. Probabilidades associadas aos valores de t encontradas quando da aplicação do teste de Wilcoxon aos resultados obtidos com o tratamento (SC1) comparados com o tratamento (SEX1).

	Tratamento SC1 X SEX1
	Probabilidades
Área (μm^2)	0,001*
Perímetro (μm)	0,007*
Largura (μm)	0,002*
Comprimento (μm)	0,009*
Largura/ Comprimento	0,123
Esfericidade	0,097
Fator Forma	0,586
F0	0,028*
F1	0,906
F2	0,025*
Simetria Lateral	0,014*
Simetria Antero Posterior	0,288

(*) $p < 0,05$, equivale diferença entre grupos

SC1 - Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem.

SSEX1 – Esfregaço de sêmen sexado, confeccionado após a sexagem antes de ser mantido a 4°C

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as cabeças espermáticas pertencentes ao tratamento SC1 e SSEX1, para as variáveis área, perímetro, largura, comprimento, Fourier 0, Fourier 2, os maiores valores foram obtidos no tratamento SSEX1 enquanto para a variável simetria lateral no tratamento SC1. As variáveis razão largura/comprimento, esfericidade, fator forma, Fourier 1 e simetria antero posterior não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 7. Médias dos parâmetros morfométricos de cabeças espermáticas de sêmen *in natura* (SC1) e sêmen sexado descongelado (SEXDESC1).

	Tratamento SC1	Tratamento SEXDESC1
	Média	Média
Área (μm^2)	30,28 ^a	32,97 ^b
Perímetro (μm)	23,45 ^a	24,38 ^b
Largura (μm)	4,54 ^a	4,75 ^b
Comprimento (μm)	8,50 ^a	8,84 ^b
Largura/ Comprimento	0,54 ^a	0,54 ^a
Esfericidade	0,30 ^a	0,30 ^a
Fator Forma	1,01 ^a	1,00 ^a
F0	1493,06 ^a	1603,46 ^b
F1	208,77 ^a	222,18 ^a
F2	109,98 ^a	125,09 ^b
Simetria Lateral	0,96 ^a	0,96 ^a
Simetria Antero Posterior	0,90 ^a	0,90 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)
SC1- Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem
SSEXDESC1: Esfregaço de sêmen sexado, após a descongelação para avaliação.

Observa-se que na Tabela 7 que as variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) os maiores valores foram obtidos com os esfregaços de sêmen sexado descongelado (SSEXDESC1). As variáveis área, perímetro, largura, comprimento, Fourier 0 e Fourier 2 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), como exposto na Tabela 8.

Tabela 8. Probabilidades associadas aos valores de t encontradas quando da aplicação do teste de Wilcoxon aos resultados obtidos com o tratamento (SC1) comparados com o tratamento (SEXDESC)

	Tratamento SC1 X SSEXDESC1
	Probabilidades
Área (μm^2)	0,000*
Perímetro (μm)	0,000*
Largura (μm)	0,000*
Comprimento (μm)	0,000*
Largura/ Comprimento	0,300
Esfericidade	0,217
Fator Forma	0,297
F0	0,001*
F1	0,068
F2	0,002*
Simetria Lateral	0,125
Simetria Antero Posterior	0,521

(*) $p < 0,05$, equivale diferença entre grupos

SC1- Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem

SSEXDESC1: Esfregaço de sêmen sexado, confeccionado após a descongelação para avaliação.

Na Tabela 10, pode-se observar as probabilidades associadas aos valores de t, obtidas com o teste de Wilcoxon (SEIGEL, 1975) na comparação entre os tratamentos SC1 e SCONV1. As variáveis razão largura/comprimento, esfericidade, fator forma, Fourier 2 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em questão. Como exposto na Tabela 9, para as variáveis razão largura/ comprimento, fator forma, os maiores valores foram encontrados no grupo tratamento SC1 enquanto para as variáveis esfericidade e Fourier 2 foram obtidos com o Grupo tratamento SCONV1.

Tabela 9. Médias dos parâmetros morfométricos de cabeças espermáticas de sêmen *in natura* (SC1) e sêmen convencional (SCONV1).

	Tratamento SC1	Tratamento SCONV1
	Média	Média
Área (μm^2)	30,28 ^a	30,19 ^a
Perímetro (μm)	23,45 ^a	23,44 ^a
Largura (μm)	4,54 ^a	4,49 ^a
Comprimento (μm)	8,50 ^a	8,53 ^a
Largura/ Comprimento	0,54 ^a	0,53 ^b
Esfericidade	0,30 ^a	0,31 ^b
Fator Forma	1,01 ^a	1,00 ^b
Fourier 0	1493,06 ^a	1507,38 ^a
Fourier 1	208,77 ^a	195,60 ^a
Fourier 2	109,98 ^a	115,40 ^b
Simetria Lateral	0,96 ^a	0,96 ^a
Simetria Antero Posterior	0,90 ^a	0,91 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)
SC1 - Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem
SCONV1 – Esfregaço de sêmen convencional descongelado para a avaliação

Tabela 10. Probabilidades associadas aos valores de t encontradas quando da aplicação do teste de Wilcoxon aos resultados obtidos com o Tratamento (SC1) comparados com o Tratamento (SCONV1).

	Tratamento SC1 X SCONV1
	Probabilidades
Área (μm^2)	0,906
Perímetro (μm)	0,687
Largura (μm)	0,381
Comprimento (μm)	0,246
Largura/ Comprimento	0,024*
Esfericidade	0,032*
Fator Forma	0,010*
Fourier 0	0,309
Fourier 1	0,332
Fourier 2	0,049*
Simetria Lateral	0,537
Simetria Antero Posterior	0,236

(*) $p < 0,05$, equivale diferença entre grupos

SC1 - Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem

SCONV1 – Esfregaço de sêmen convencional descongelado para a avaliação

Na avaliação da compactação de cromatina espermática entre o grupo tratamento SC2 e SEXDESC2, a Tabela 11 apresenta as médias e desvio padrão obtidos para as variáveis intensidade de compactação de cromatina (CCROM) e coeficiente de variação de pixels (CV), e observa-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) utilizando teste t de Student entre os grupos para a variável intensidade de compactação de cromatina (CCROM).

Tabela 11. Médias \pm desvios padrão (%) das medidas intensidade de compactação de cromatina e coeficiente de variação de pixels obtidas na análise das cabeças espermáticas de sêmen *in natura* e sêmen sexado.

	Grupo SC2	Grupo SSEX2
	Médias \pm DP	
Compactação Cromatina (CCROM)	0,935 \pm 0,25 ^a	1,29 \pm 0,58 ^b
Coefficiente variação de pixels (CV)	3,25 \pm 0,58 ^a	3,76 \pm 1,31 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas entre médias ($p < 0,05$)

SC2 - Esfregaço de sêmen *in natura* confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem

SSEXDESC2 – Esfregaço de sêmen sexado, confeccionado após a sexagem antes de ser mantido a 4°C

DP – desvio padrão

V. DISCUSSÃO

Os ejaculados foram selecionados segundo critérios mínimos de qualidade, motilidade $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 e concentração ≥ 1 milhão de sptzs/ mL, já que a eficiência da separação tem grande relação com as qualidades físicas iniciais das amostras aprovadas para seleção (SEIDEL, GARNER; 2002).

Pode-se observar de acordo com os resultados obtidos na comparação entre os tratamentos SC1 e SSEX1 há diferenças significativas ($p < 0,05$) para as variáveis área, perímetro, largura, comprimento, Fourier 0, Fourier 2 e simetria lateral. As alíquotas dos ejaculados aprovados para separação por citometria de fluxo, anteriormente ao processo propriamente dito, são diluídas, coradas e incubadas. Este processamento e as diferentes soluções antes e durante o processo de sexagem poderiam levar à alteração no volume celular e consequentemente alterações das variáveis citadas, pois a célula espermática parece sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores (BALL, VO; 2001)

Na avaliação entre o tratamento SC1 e SSEXDESC1 as variáveis área, perímetro, largura, comprimento, F0, F2, simetria lateral, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com os maiores valores encontrados no tratamento SSEXDESC1. Estes resultados foram diferentes dos relatados por Gravance et al., (1998b); Estesso et al. (2006); porém nos experimentos anteriores para criopreservação espermática foram utilizados diluentes a base de Tris-gema de ovo e ou leite, porém nenhum dos experimentos citados utilizou o meio comercial Bioxcell (IMV, Technologies – Anexo 1), o qual foi utilizado para criopreservação do sêmen sexado e sêmen convencional no estudo em questão.

Os resultados sugerem que diferentes fatores podem ter influenciado para que as cabeças espermáticas avaliadas no tratamento SEXDESC1, apresentassem valores elevados nas variáveis observadas, o que afirma os relatos de Amann, Pickett, (1987); Hammerstedt et al, (1990), que pelo fato do processo de criopreservação ser dividido em etapas distintas: diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e descongelação. Cada uma

dessas etapas tem uma relação com a funcionalidade e metabolismo celular do espermatozóide.

Em humanos (THOMPSON et al., 1994), touros (GRAVANCE et, 1998), eqüinos (ARRUDA et al, 2002), caninos (RIJSSELAERE et al, 2004), caprinos (HIDALGO et al, 2007), foram avaliados os efeitos da criopreservação espermática sobre variáveis morfométricas utilizando análise computadorizada por ASMA, e em todos os estudos anteriormente citados, as cabeças espermáticas foram significativamente menores em espermatozoides criopreservados do que naqueles apenas diluídos, resultados estes que diferiram dos obtido neste estudo.

Observou-se que os resultados obtidos com os tratamentos SC1 e SCONV estão de acordo em partes com os obtidos por Gravance et, (1998) para a variável largura/ comprimento. Os resultados deste trabalho sugerem que alterações na morfometria da cabeça dos espermatozoides indica a capacidade com qual estas células sobrevivem ao processo de criopreservação.

Durante o processo de criopreservação a porcentagem de células que sobrevivem ao processo é determinado pela sensibilidade ao estresse osmótico a que são submetidas durante a adição e remoção de crioprotetores, esfriamento e descongelamento (LEIVO, BRADLEY, 1999). No presente estudo, as células espermáticas são submetidas a diluições, processo de separação por citometria de fluxo e criopreservação. Apesar das alterações morfométricas observadas, após a descongelação as amostras apresentaram motilidade aceitável dentro dos padrões estabelecidos para comercialização.

Na avaliação do efeito da sexagem de sêmen por citometria de fluxo sobre a variável intensidade de compactação de cromatina (CCROM) e coeficiente de variação da escala de cinza (CV), foram encontradas diferenças na intensidade da compactação da cromatina ($p < 0,05$). Esta diferença demonstra que o processo de sexagem afeta a compactação da cromatina dos espermatozoides, no entanto, a intensidade de descompactação (1,29%) é semelhante à encontrada por Beletti et al (2005b) e Silva (2006) para touros altamente férteis. Isto demonstra que estas alterações provavelmente não

influenciam na fertilidade o que está de acordo com os resultados obtidos por Bochenek et al., 2007. Porém, está parcialmente de acordo com os resultados obtidos por Gry et al (2005), que em seus estudos investigou se o processo de separação por citometria de fluxo afetava a integridade do DNA espermático. Estes autores usaram para avaliar sêmen sexado e sêmen convencional o ensaio de Cometa e a análise de estrutura de cromatina (SCSA). Os espermatozóides portadores de cromossomos -X e -Y separados por citometria de fluxo, apresentaram um baixo DFI (Índice de Fragmentação de DNA) comparado com o sêmen convencional. Seus resultados indicaram que o sêmen sexado por citometria de fluxo apresentaram menor alteração na cromatina que amostras de sêmen convencional. A inexistência de diferença estatisticamente significativa em relação ao coeficiente de variação, mostra que as alterações na compactação da cromatina observadas após o processo de sexagem ocorrem de maneira homogênea por toda a cabeça do espermatozóide. De acordo com Beletti et al (2004), existem regiões na cabeça do espermatozóide de touro que são mais susceptíveis às alterações da cromatina, levando a descompactação heterogênea, o que não foi verificado neste trabalho.

Vários fatores poderiam ter influenciado no estudo em questão para alteração na compactação da cromatina espermática durante o processo de sexagem. Além de reais alterações ocorridas na compactação, a coloração do DNA espermático com Hoechst 33342 (Sigma, Aldrich), um corante vital utilizado durante o processo de separação (PARILLA et al, 2004), pode ter interferido na coloração do DNA com azul de toluidina, provocando erros de avaliação no método utilizado.

VI. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, dentro das condições de realização deste experimento, conclui-se que:

- O processo de diluição, coloração, incubação anterior ao processo de separação por citometria de fluxo e criopreservação influenciou na morfometria das células espermáticas.
- A cromatina espermática sofre alterações significativas durante o processo de separação por citometria de fluxo, porém ainda permanecendo em níveis considerados normais para reprodutores bovinos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N. **Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine**. 2001.84f. Tese (Livre – docência) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2001.

AMANN, R.P.; PICKET, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v.7, p.145-173, 1987.

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

ARRUDA,R.P.; BALL,B.A.; GRAVANCE,C.G.; GARCIA,A.R.; LIU,I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, Stoneham, v.58, p.253-256, 2002.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Porto Alegre,v.31, n.1, p.8-16, 2007.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.21, n.1, p. 1-7, 2000.

BAKER, H.W.G; CLARKE, G.N. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. **Clinical Reproduction and Fertility**, v.5, p.37-43, 1987.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, New York, v.93, p.298-305, 1982.

BALHORN, R., CORZETT, M., MAZRIMAS, J., and WATKINS B. Identification of bull protamine disulfides. **Biochemistry**, Washington, v. 30, p.175-181, 1991.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.22, p.1061-1069, 2001.

BALLACHEY, B.E.; HOHENBOKEN, W.D.; EVENSON, D.P. Heterogeneity of Sperm Nuclear Chromatin Structure and Its Relationship to Bull Fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.36, p.915-925, 1987.

BALLACHEY, B.E; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance in bulls, **Journal of Andrology**, Lawrence, v.9. p.109-115,1988.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames : Iowa State University Press; 1989.

BEAL, W.E.; WHITE, L.M.; GARNER, D.L. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. **Journal Animal Science**, Champaign, v.58, p.1432 – 1436, 1984.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.1, p.97-103, 1996.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology**, Saint Louis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P.A. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore , v.79, n.1, p. 17-23, 2004

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P.A. Spectral framework for sperm shape characterization. **Computers in Biology and Medicine**, Elmsford, v. 35, p. 463-473, 2005a.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa, **Brazilian Journal of morphological Science**, Campinas, v. 22, n.2, p. 85-90, 2005.

BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nyt klassificeringssystem for tyrens spermiogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v.25, p.383-391, 1973.

BOCHENEK, M.; HERJAN, T.; SMORAG, Z. Influence of sexing procedure on bull sperm chromatin structure. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.296-296, 2007.

BRITO, C.M.C.; MELLO, M.L.S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "Pé duro" bulls. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.11, n.2, p.349-354, 1988.

BUENDÍA, P.; SOLER, C.; PAOLICCHI, F.; GAGO, C.; URQUIETA, B.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm – Class Analyzer[®] computer assisted system. **Theriogenology**, Stoneham, v.57, p.1207-1218, 2002.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** Pirassununga, 2005.188f. Tese de Doutorado universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, 2005.

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, manual, Belo Horizonte, 1998, 49p.

COSTA, L. F.; CESAR Jr, R. M. **Shape analysis and classification: theory and practice**, Boca Raton, CRC, 2001. 680p.

CUI, H.; MATTEW, C.D. X larger than Y. **Nature**, London, v.366, p.117-118, 1993.

DAVIS, R. O.; BAIN, D. E.; SIEMERS, R. J.; THAL, D. M.; ANDREW, J. B.; GRAVANCE, C. G. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 58, n. 4, p. 763-769, 1992.

DOBRINSKI, I.; HUGHES, J.P.A.; BARTH, A.D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.101, p. 531 -538, 1994.

DUNPHY, B.C.; KAY, R.; BARRAT, C.L.R.; COOKE, I.D. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.10, p.378-385, 1989.

DURAN, E.H.; GÜRGAN, T.; GÜNALP, S.; ENGINSU, M.E.; YRALI, H.; AYHAN, A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, n.5, p.1235-1239, 1998.

ELLINGTON, J. E.; EVENSON, D.P.; FLEMING, J.E.; BRISBOIS, R.S.; HISS, G.A.; BRODER, S.J.; WRIGHT, R.W.JR. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 69, n.4, p.643-49, 1998.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.22, p.4553, 2001.

ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I.; ERENPREISA, J.E.; SPANO, M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation : comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. **Human Reproduction**, Oxford, v.19, n.10, p. 2277-2282, 2004.

ERICSSON, R. J.; LANGERRIN, C.N.; NISHIRRO, M. Isolation of fraction rich in Human Y sperm, **Nature**, London, v.246, p.421-424, 1973.

ESTESO, M.C.; FERNANDEZ-SANTOS, SOLER, A.J.; MONTORO, V.; M.R.; QUINTERO –MORENO, A.A.; GARDE, J.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. **Reproduction Domestic Animal**, v. 41, p.241-246, 2006.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v.210, p.1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v.14, p.1039-1049, 1999.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with others techniques. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.23, 25-43, 2002.

FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, Stoneham, v.59 (suppl.1), p.125-138, 2003.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M., FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa . **Andrologia**, Berlin, v.30, p.85-89, 1998.

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

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DEJARNETTE, J.M.; ALLEN, C.H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 31-40, 2001.

GARRETT, C.; BAKER, H.W. A new fully automed system for the morphometric analysis of abnormal bovine spermatozoa heads. **Fertility and Sterility**, Birgminghan, v.63, 1306-1317,1995.

GERGELY, A.; KOVANCI, E.; SENTURK, L.; COSMI, E.; VIGUE, L.; HUSZAR, G. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2007-2014, 1999.

GLEDHILL, B. L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.7, p. 1-20, 1966.

GLEDHIL, B.L. Changes in deoxyribonucleoprotein in relation to spermatelioses and the epididymal maturation of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, (suppl.13), p.77-88,1971a.

GLEDHIL, B.L, DARZYNKIEWCZ, Z.; RINGERTZ, N.R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermatogenesis in bull: increased [³H]

actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa . **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 26, p. 25-38, 1971b.

GORCYZA, W.; GONG, J.; DRAZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. **Cancer Research**, Baltimore,v.53, p. 1945-1951, 1993.

GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 16, n. 1, p. 88-93, 1995.

GRAVANCE, C.G.; LIU, I.; DAVIS, R.; HUGHES, J.; CASEY, P. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 41-46, 1996.

GRAVANCE, C. G et al. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 47, n. 1/2, p.149-155, 1997.

GRAVANCE, C.G.; CHAMPION, Z.J.; SAX – GRAVANCE, S.K.; CASEY, P.J. Percentage of normal sperm heads is significantly increased by Percoll separation of semen. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p.116-119, 1998a.

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

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D.; PITT, C.; VISHWANATH, R.; SAX – GRAVANCE, S.; CASEY, P. Replicate and technician variation associated with

computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 2, p. 77-82, 1999.

GRY B, B.H.; IAN, D.M.; ANNETTE,K.E.; TORBEN,G.; PREBEN,C. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, p.1789-1802, 2005

HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. 6^o edição. São Paulo: Manole, 1995. Capítulo 7. p. 95 – 125, 1995.

HAMMADEH, M.E.; AL-HASSANI,S.; STIEBER,M.; GAUSS,C.; ROSENBAUM,P.; GEORG,T.; DIEDRICH,K.; SCHMIDT,W. The effect of chromatin condensation (Aniline Blue) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic programme. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, p.2468-2471, 1996.

HAMMADEH, M.E.; STIEBER, M.; HAIDI,G.; SCHMIDT, W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. **Andrologia**, Berlim, v.30, n.1, p.29-35, 1998.

HAMMADEH, M.E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHMIDT, W.; STREHLER, E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology** , New York, v.46, p.99-104, 2001.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.11, p. 73-88, 1990.

HARR, R. Characterization of spermatozoa by planar morphometry. **Clinical Laboratory Science**, Washington, v. 10, n. 4, p.190-196, 1997.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J.; PÉREZ, C.C.; SANZ, J. Comparison of three staining procedures used for computer – assisted back sperm head morphometry analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.39, p.271, 2004.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.100, P.61-72, 2007.

HIGUCHI, H. et al. Application of computer-assisted sperm analysis system to elucidate lack of effects of cyclophosphamide on rat epididymal sperm motion. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 26, n. 2, p.75-83, 2001.

HIRAI, M. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 1, p.104-110, 2001.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, p.47-58, 2000.

HOSSEPIAN, V.F.L. **Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**, 1998, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética) Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo.

HUNTER, R.H.F. **Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p.310.

JAGOE, J. R.; WASHBROOK, N. P.; HUDSON, E. A. Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 39, n. 12, p. 1347-1352, 1986.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNINSSON, A.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, p.743-758, 2003.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.197, p.389-394, 1990.

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

JOHNSON, L.A.; WILKER, C.E.; CERELLI, J.S. Spermatogenesis in the bull. Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, 9-27, 1994.

JOHNSON, L.A. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA difference: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v.7. p.893-903, 1995.

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

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

KARABINUS, D.S.; EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; BAER, R.K.; KAPTOTH, M.T. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p.2364-2371, 1990.

KATZ, D. F.; OVERSTREET, J.W.; SAMUELS, S.J.; NISWANDER, P.W.; BLOOM, T.D.; LEWIS, E.L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 7, n. 4, p. 203-210, 1986.

KONDRACKI, S.; BANASZEWSKA, D.; MIELNICKA, C. The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.10, p.3-13, 2005.

KOSOWER, N.S., KATAYOSE, H., YANAGAMACHI, R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.13, p.342-348, 1992.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAM, P.; VISHWANATH, R.; Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v.12 (5-6), p.251-261, 2000.

KRUGER, T.F.; DUTOIT, T.C.; FRANKEN, D.R.; ACXOSTA, A.A.; OEHNINGER, S. CX.; MENKVELD, R.; LOMBARD, XC.J. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. **Fertility and Sterility**, Birmingham, V59, p.202-209, 1993.

LARSON – COOK, K.L.; BRANNIAN J.D.; HANSEN, K.A.; KASPERSON, K.M.; AAMOLD, E.T.; EVENSON, D.P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.80, p.895-902, 2003.

LEIVO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon. The male gamete. McGill University., v.46, p.502-517, 1999.

LOPES,S.; SUN, J.G.; JURISICOVA, A.;MERIANO, J.; CASPER, R.F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality sêmen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, Birmingham ,v.69, p.528-532, 1998.

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

MACLEOD, I. C.; IRVINE, D. S. The predictive value of computer-assisted analysis in the context of a donor insemination programme. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 580-586, 1995.

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; BÁO, S.N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze - dried

bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.1, p. 94-104, 2007.

MAXWELL, W.M.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v.8, p.1165-1178, 1996.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Berlin, v. 74, p. 387-92, 1982.

MCCOSKER, P.J. Abnormal spermatozoa chromatin in infertile bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.18, p.363,1969.

MCKELVEY – MARTINS,V.J.; MELIA, N.; WALSH, I.K.; JOHNSTON, S.R.; HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; THOMPSON, W. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder: and (2) human sperm and male infertility. **Mutation Research**, Amsterdam,v.375, p.93-104, 1997.

MCPHERSON, S.; LONG, F.J. Chromatin structure function during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatidis. **European Journal of Histochemistry** , v.37, p.109-128,1993.

MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E.; ABDEL – HAFEZ, M.A.; THOMAS, A.J. Jr.; AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, Oxford, v.19, p.129-138, 2004.

NICHOLAS, F.W.; SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.36, p.341-353, 1983.

NÚÑEZ – MARTINEZ, I.; MORAN, J.M.; PRÑA, F.J. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v.30,p.182-189, 2007.

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

OMBELET, W,; POLLET, H.; BOSMANS,E.; VEREECKEN,A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, p.1015-1020,1997.

OSTERMEIER, G.C.; SARGENT, G. A.; YANDEL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n.4, p. 595-603, 2001a.

OSTERMEIER, G.C.; SARGENT, G. A.; YANDEL, B.S.; PARRISH, J.J. Measurements of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.22, p.584-594, 2001b.

PACE, M.M. Implications of sexed semen on the beef industry. In: ANNUAL FLORIDA BEEF CATTLE SHORT COURSE, 39., 1990, Gainesville. **Proceedings...**[s.l.:s.n.], 1990, p.228.

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

PARILLA, I.; VÁZQUEZ, J.M.; CUELLO,C.; GIL, M.A.; ROCA,J.; BERARDINO, D.DI.; MARTÍNEZ, E.A. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow – sorted boar spermatozoa. **Reproduction Research**, v.128, p.615 – 621, 2004.

PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproduktionsmedizin Endokrinologie** , v.2, p. 101-105, 2007.

PRIETO M., MAKI, A.H., BALHORN R. Analysis of DNA protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. **Biochemistry**, v.36, p.11944-11951, 1997.

RENS, W.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome bearing sperm. **Cytometry**, New York, v.33, p.476-481, 1998.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; HOFACK,G.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton – Thorne analyzer. **Theriogenology**, Stoneham, v.62, p. 1292-1306, 2004.

ROCHA, H.L.O.G.; BELLETI, M.E.; COSTA, E.N. Comparação entre a eficiência da coloração com “Acridine Orange” e Azul de toluidina na identificação de anomalias no complexo DNA-proteína de espermatozoides humanos. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.258-259, 1999. Suplemento.

RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M.; DORADO, J.; PÉREZ, C.C.; SANZ, J. Effect of three staining procedures on the accuracy of image processing and stallion sperm head morphometry using the Sperm Class Analyzer (SCA). **Reproduction Domestic Animal**, v.39, p.266, 2004.

SAACKE, R.G. Components of semen quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.55, p.1. 1982.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, New York, v.24, p.167-173, 1996.

SAKKAS, D., MANICARDI, G., BIANCHI, P.G., BIZARRO, D., BIANCHI, U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.52, p.1140-1155, 1995.

SAKKAS, D., MARIETHOZ, E., MANICARDI, G., BIZARRO, D., BIANCHI, P.G., BIANCHI, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v.4, p. 31-37, 1999.

SANCHO, M.; PEREZ-SANCHEZ, F.; TABLADO, L.; DE MONSERRAT, J.J.; SOLER, C. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 1, p. 27-37, 1998.

SCHRADER, S. M.; TURNER, T. W.; SIMON, S. D. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers: sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 11, n. 1, p. 32-39, 1990.

SEIDEL Jr, G.E.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; DOYLE, S.P.; BRINK,Z.; GREEN, R.D. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham,v.52(8), p.1407-1420, 1999.

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

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

SEKONI, V.O.; GUSTAFSSON, B.K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. **British Veterinary Journal**, London, v.143, p.312-317, 1987.

SHEKARRIZ, M.; DEWIRE, D.M.; THOMAS, AJ.JR.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, v. 28, p. 31-35, 1995.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw – Hill. São Paulo, 350p., 1975.

SILVA, R. T. **Correlação da morfometria e da compactação da cromatina de espermatozoides de touro zebuino sobre a taxa de clivagem e formação de blastocistos em programas de produção "in vitro"**. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, 2006. 37p.

SILVEIRA, J.M.; FONSECA, M.G. Inovações tecnológicas na pecuária bovina brasileira: inseminação artificial e transferência de embriões. In: Simpósio de Gestão á inovação tecnológica, 20. São Paulo, 1998.

SOTOLONGO, B.; HUANG, T.T.F.; ISENBERGER,E.; WARD, S. An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.26, n.2, 2005.

SPANÓ, M.; KOLSTAD, A.H.; LARSEN, S.B.; CORDELLI, E.; LETER, G.; GIWERCMAN, A.; BONDE, J.P.; ASCLEPIOS. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, n.9, p. 2495 – 2505, 1998.

SPANÓ, M.; BONDE, J.P.; HJOLLUND, H.I.; KOLSTAD, H.A.; CORDELLI, E.; LETER, G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. **Fertility and Sterility**, Birmingham,v. 73, p. 43-50, 2000.

STEIGERWALD, P.; KRAUSE, W. Estimation of sperm morphology using a new CASA system. **Andrologia**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 23-27, 1998.

STORNELLI,M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

TEJADA ,R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN,A.; MARIK,J.; FREIDMAN,S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.42, p.87-91, 1984.

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

UNANIAN, M. M. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Ministério da Agricultura – Embrapa, Doc. 56, dez/2000.

VILFAN, I.D.; CONWELL, C.C.; HUD, N. Formation of native like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n.19, p.2088-2095, 2004.

WARD, W.S.; COFFEY, D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**, New York, v.37, p. 569 -574, 1991.

WARD, W.S., Chromosome organization in mammalian sperm nuclei. In Genetics of Human Male Infertility, pp 205-221. Eds C Barratt, C de Jonge, D Mortimer and J Parinaud., Editions EDK, Paris,1997.

WACHTEL, S.S., H-Y antigen and biology of sex determination. New York: Grune and Stratton, p.302, 1983.

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

WIJCHMAN, J.G.; WOLF, D.E.; BEN, T.H.M.; GRAAF, R.; ARTS, E.E.J.M. Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 5, p. 773-780, 2001.

ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60 (9), p.1657-1663, 2003.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSIÇÃO BIOXCELL (IMV, Technologies)

TRIS	2,30g
CITRATO DE SÓDIO.....	6,20g
CLORETO DE POTÁSSIO.....	0,80g
FRUTOSE.....	1,20g
MONOHIDRATO DE LACTOSE.....	0,80g
GLICINA.....	0,20g
GLICOSE ANIDRA.....	0,20g
TAURINA.....	0,005g
SULFATO DE GENTAMICINA.....	0,24g
TARTRATO DE TILOSINA.....	0,33g
LINCOSPECTINA 100.....	0,383g
GLICEROL.....	40,20g
HIDRATO DE CÁLCIO LACTATO.....	0,70g
LECITINA DE SOJA.....	1,5g
MONOHIDRATO DE ÁCIDO CITRICO.....	2,50g
ÁGUA ULTRA PURA.....	0,065g

PH: 6.8 – 7.3

OSMOLARIDADE: 1250 – 1450 mosm/ Kg H₂O

ANEXO 2

Curva de congelação utilizada pela TK 3000 (TK - Máquinas de Congelação – Embrião e Sêmen)

F1 – 0,1^o C/ segundo – entre 4^o a – 15^o C duração: 3 minutos

F2 – 0,5^o C/ segundo – entre – 15^o C a – 140^o C duração: 5 minutos