

## VARIAÇÕES METODOLÓGICAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SEXADO DE BOVINOS\*

Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>1</sup>  
José Antonio Dell'Aqua Jr<sup>2</sup>  
André Maciel Crespilho<sup>1</sup>  
Frederico Ozanam Papa<sup>2</sup>  
Fernanda Da Cruz Landim-Alvarenga<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de três diferentes protocolos de refrigeração para a congelação de sêmen sexado bovino, pela citometria de fluxo. Foram utilizados dois ejaculados de 10 touros, após a colheita do sêmen este foi processado para a separação dos espermatozóides X e Y. Após a separação pelo citômetro, as amostras foram divididas em três grupos: controle (C), os espermatozóides eram depositados em meio sem glicerol e acondicionados a 5°C/90 minutos; grupo 1 (G1), os espermatozóides eram depositados em meio sem glicerol e acondicionados a 18°C/90 minutos; grupo 2 (G2), os espermatozóides eram depositados em meio com glicerol e acondicionados a 5°C/90 minutos. Posteriormente as amostras eram envasadas em palhetas e submetidas à congelação. Após a descongelação foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: análise da cinética espermática pelo sistema computadorizado (CASA), integridade das membranas espermáticas e potencial mitocondrial pela microscopia de epifluorescência. Para análise estatística dos dados utilizou-se ANOVA e teste Tukey quando necessário, com nível de significância  $p < 0,05$ . Em relação às análises da cinética espermática foi verificado que os valores obtidos de velocidade linear pelo grupo G1 (82,3µm/s) foram inferiores em relação ao G2 (90,5µm/s) e C (89,7µm/s); e para velocidade curvilínea, o grupo C (206,6µm/s) apresentou valores superiores a G1 (183,0µm/s), sendo G2 (194,2µm/s) similar a ambos. Já para integridade de membrana plasmática o grupo G2 (34,7%) apresentou valores significativamente inferiores ao C (39,4%) e G1 (41,6%), entretanto a função mitocondrial apresentou valores superiores para o grupo C (62,6%) em relação ao G1 (47,5%); sendo o G2 (51,1%) similar a ambos. Com relação aos resultados obtidos pode-se concluir que os três protocolos de refrigeração adotados para a congelação de sêmen sexado bovino apresentaram poucas variações. Assim novos estudos são necessários para aprimorar o procedimento de criopreservação de sêmen sexado bovino.

**Palavras-chave:** sêmen sexado, bovino, refrigeração, glicerol, congelação.

## VARIACIONES METODOLÓGICAS EN CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN SEXADO DE BOVINOS

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de 3 protocolos diferentes de refrigeración para congelar semen sexado bovino mediante citometria de flujo. Se utilizaron dos eyaculados de 10 toros, después de la colecta del semen se procesó para la separación de espermatozoides

\* Agradecimento a CAPES, Lagoa da Serra e Sexing Technologies

<sup>1</sup> Alunos de doutorado – FMVZ – UNESP Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.  
Correspondência: Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Fone-Fax: 14-38116249, cpaulafreitas@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

X e Y. Después de la separación por el citómetro, las muestras se dividieron en 3 grupos: control (C), los espermatozoides fueron colocados en medio sin glicerol y almacenados en 5°C/90 minutos, grupo 1 (G1), los espermatozoides fueron colocados en un medio sin glicerol y almacenados en 18°C/90 minutos, grupo 2 (G2), los espermatozoides fueron depositados en un medio con glicerol y almacenados a 5°C/90 minutos. Posteriormente las muestras se almacenaron en pajuelas y sometidos a la congelación. Después de la descongelación se evaluaron los siguientes parámetros del esperma: análisis de esperma de la cinética a través de un sistema computarizado (CASA), integridad de las membranas espermáticas y el potencial mitocondrial por el microscopio de epifluorescência. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA y prueba de Tukey, cuando necesario, con nivel de significación  $p < 0,05$ . Para el análisis cinético de los espermatozoides se encontró que los valores de la velocidad lineal de G1 (82,3µm/s) fueron inferiores en comparación con el G2 (90,5µm/s) y C (89,7µm/s) y para la velocidad curvilínea, grupo C (206,6µm/s) presentó valores superiores a G1 (183,0µm/s) y G2 (194,2µm/s) similar a los dos. En cuanto a la integridad de la membrana plasmática el G2 (34,7%) presentó valores significativamente más bajo que el C (39,4%) y G1 (41,6%), sin embargo los valores de la función mitocondrial fueron mejores en el Grupo C (62, 6%) en comparación con el G1 (47,5%) y G2 (51,1%) similar a los dos. En cuanto a los resultados obtenidos se puede concluir que los tres protocolos adoptados para la refrigeración de la congelación de semen sexado bovino mostraron poca variación. Así, se necesitan más estudios para mejorar el procedimiento de la criopreservación de semen sexado de la especie bovina.

**Palabras-clave:** sêmen sexado, vacuno, de refrigeración, glicerol, congelación.

## METHODOLOGICAL VARIATIONS ON CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEXED SEMEN

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of 3 different cooling protocols for freezing bovine sexed semen by flow cytometry. It was used two ejaculates of 10 bulls, after collection of semen that was processed for separation of X and Y sperm. After separation by the cytometer, the samples were divided into 3 groups: control (C), the sperm were placed in medium without glycerol and stored at 5°C/90 minutes, group 1 (G1), the sperm were placed in medium without glycerol and stored at 18°C/90 minutes, group 2 (G2), the sperm were placed in medium with glycerol and stored at 5°C/90 minutes. Subsequently the samples were stored in straws and subjected to freezing. After thawing, samples were evaluated following sperm parameters: sperm analysis of the kinetics through a computerized system (CASA), the sperm membrane integrity and mitochondrial potential by epifluorescence microscopy. For statistical analysis it was used ANOVA and Tukey's test where appropriate, with significance level  $P < 0.05$ . For the kinetic analysis of sperm was found that the values of linear velocity by G1 (82.3µm/s) were lower as compared to G2 (90.5µm/s) and C (89.7µm/s) and for curvilinear velocity, group C (206.6µm/s) showed values higher than G1 (183.0µm/s) and G2 (194.2µm/s) similar to both. For plasma membrane integrity G2 (34.7%) had significantly lower than C (39.4%) and G1 (41.6%), however mitochondrial function values were higher in group C (62, 6%) compared to G1 (47.5%); and, G2 (51.1%) was similar to both. Based on the results obtained can be conclude that 3 protocols adopted for cooling the freezing of semen sexed cattle showed few variation. Thus further studies are needed to improve the procedure of cryopreservation of bovine sexed semen.

**Key words:** sexed semen, bovine, refrigeration, glycerol, cryopreservation.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne. Isto se deve, em grande parte, ao emprego de algumas biotecnologias que promovem uma maior eficiência ao sistema de produção a menor custo. Dentre as biotecnologias aplicadas à reprodução, a sexagem espermática, sendo utilizada de forma comercial mais ampla, acrescentará grandes benefícios à criação nacional, proporcionando um aumento substancial do número de matrizes, imprimindo maior velocidade na seleção genética. Entretanto, para essa biotecnologia ser mais utilizada nos diferentes sistemas de produção de bovinos, há necessidade dos resultados de fertilidade serem maiores e mais homogêneos.

Vários procedimentos de sexagem espermática (1) têm sido descritos até o momento, entretanto apenas uma técnica baseada na mensuração da diferença na quantidade de DNA entre as células portadoras do cromossomo X e Y tem apresentado eficácia comprovada e viabilidade econômica. No caso da espécie bovina os espermatozóides portadores do cromossomo X apresentam em média 3,8% mais conteúdo de DNA do que os portadores do cromossomo Y. Assim, por meio de sondas fluorescentes, como HOESCHT 33342, as células são coradas e, ao passarem no citômetro de fluxo (2), são separadas de acordo com a intensidade de fluorescência.

Durante o processo de separação celular, na citometria de fluxo, o espermatozóide é submetido a vários tipos de estresses (mecânicos e químicos), os quais podem causar danos na membrana plasmática e no DNA (3,4). Embora o processo de separação espermática possa danificar os espermatozóides, esta etapa é apenas uma parte integrante do procedimento. A célula espermática necessita ainda ser processada para a criopreservação e, dessa forma, é exposta a procedimentos inerentes à congelação e descongelação, fatores que promovem mais injúria aos espermatozóides, resultando em baixa capacidade fecundante após a inseminação artificial (5) e baixa taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*, em comparação com a utilização do sêmen não sexado (6).

Garner (7) e Garner e Seidel (8) analisaram a viabilidade espermática pela utilização de SYBR-14 e iodeto de propídio (IP), observando alguns danos de descontinuidade da membrana plasmática durante o processo de separação pelo citômetro e após o processo de centrifugação, passos importantes na produção de sêmen sexado. Ainda que, durante o processo de separação as células mortas e com danos sejam eliminadas, as células viáveis tendem a morrer rapidamente, quando comparadas com as células não sexadas, principalmente de suínos e bovinos (9). Deste modo, uma boa viabilidade espermática, após o procedimento de separação, é essencial para que suporte do processo de criopreservação. O desenvolvimento de métodos de criopreservação, capazes de proteger melhor a célula, é fundamental para que o sêmen sexado apresente maior viabilidade pós-descongelação (10).

Dentre as várias mudanças ocorridas durante o processo de separação por citometria de fluxo, a adoção da diminuição da pressão exercida durante a passagem dos espermatozóides pela câmara de fluxo, resultou em uma queda considerável dos danos mecânicos ocorridos nas células (11,12). Esse procedimento, aliado às novas mudanças no processo de congelação (10), levou a uma taxa de fertilidade equivalente a 90% daquela obtida com sêmen o convencional, quando utilizado com um manejo adequado das fêmeas (13).

Um passo importante no processo de congelação do sêmen sexado é a refrigeração das amostras de 25°C até 5°C, período no qual, permanece por no mínimo 90 minutos. O resfriamento, quando efetuado de modo inadequado, causa choque térmico, o qual induz a danos parcialmente irreversíveis ao espermatozóide, caracterizado por um padrão anormal de movimento do espermatozóide (movimento circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, lesões no acrossoma, dano à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. Vários danos são decorrentes das

alterações da membrana, à medida que os espermatozóides progridem para as mudanças de fase de transição e durante o resfriamento (14).

O glicerol e a gema de ovo atuam como crioprotetores também durante a refrigeração inicial, protegendo as células principalmente até atingirem 15°C, fase de transição dos fosfolípidos da membrana plasmática, quando passam do estado fluido para o de gel. O glicerol induz mudanças nos eventos citoplasmáticos, pois aumenta a viscosidade ao penetrar na célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético, além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (15).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes temperaturas de refrigeração e da adição de glicerol, durante a refrigeração, sobre a congelação de sêmen sexado bovino, através de citometria de fluxo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Dez touros, de diferentes raças (cinco *Bos taurus taurus* e cinco *Bos taurus indicus*), em idade reprodutiva e pré-testados de acordo com Rath et al. (16), foram utilizados. O sêmen foi colhido com vagina artificial e dois ejaculados de cada touro foram processados. A concentração espermática foi determinada por espectofotômetro (DUPREE®, Chino, Califórnia, EUA). A motilidade total e progressiva (aumento de 100X), bem como a morfologia espermática (aumento de 1000X), foram avaliadas em microscópio de contraste de fase (OLYMPUS AX70, Melville, Nova York, EUA). Apenas ejaculados com concentração superior a  $1500 \times 10^6/\text{mL}$ , motilidade total  $\geq 80\%$ , motilidade progressiva  $\geq 60\%$  e defeitos totais  $\leq 20\%$ , de acordo com as recomendações da central de processamento de sêmen foram utilizados para a sexagem espermática e posterior congelação.

A separação dos espermatozóides foi realizada em citômetro de fluxo (MoFlo® SX, Cytomation Inc., Fort Collins, EUA), equipado com laser diodo semiconductor de 635nm, detectores de fluorescência e agulha Cytonozzle® para orientação do espermatozóide (17), com pressão de 40 psi (18). Para o processo de criopreservação do sêmen foi utilizado o diluidor Tris-gema de ovo (Sexing Technologies, Navasota, EUA).

### Processamento do sêmen

Após a separação pelo citômetro, as amostras foram divididas em três grupos: controle (C), onde os espermatozóides eram depositados em meio a base Tris-gema de ovo com osmolaridade de 280 mOsmol/Kg de água sem glicerol até o volume atingir 15mL e, então acondicionados a 5°C/90 minutos; grupo 1 (G1), onde os espermatozóides eram depositados em meio a base Tris-gema de ovo com osmolaridade de 280 mOsmol/Kg de água sem glicerol até o volume atingir 15 mL e, então acondicionados a 18°C/90 minutos; e, grupo 2 (G2) onde os espermatozóides eram depositados em meio idêntico aos grupos anteriores acrescido de 12% de glicerol até completar o volume de 15 mL, e então acondicionados a 5°C/90 minutos. Após este período nos grupos C e G1 foram acrescidos de meio conteúdo glicerol a 12% em duas etapas de 7,5 mL a cada 15 minutos. Já no grupo G2 foram acrescido 15 mL de meio Tris-gema de ovo contendo 10% de glicerol, também em duas etapas de 7,5 mL a cada 15 minutos. Sendo assim, a concentração final de glicerol de todos os grupos foi 6%.

Após estes procedimentos, as amostras foram centrifugadas a  $800 \times g$ , por 20 minutos, em centrífuga refrigerada (SORVALL® RC-4 – Heareus Sorvall Revco, Asheville, NC), a 5°C para C e G2, e 18°C para G1. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” homogeneizado; uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração pós-separação. A concentração espermática foi ajustada para  $20 \times 10^6$  células/mL utilizando-se diluidor Tris-gema a 6% de

glicerol. A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV, Aigle, França), na dose de  $5 \times 10^6$  células/palheta, para uma melhor avaliação espermática. Após 3 horas de estabilização a 5°C, as amostras foram congeladas em congelador automático (IMV, Aigle, França), com curva de -3°C/min a partir de 5°C até -5°C, e -40°C/min de -5°C a -140°C; então armazenadas em nitrogênio líquido até posterior análise.

### **Análise computadorizada do sêmen**

O sêmen foi descongelado em banho-maria à 37°C por 30 segundos, depositado em criotubos (1,5mL) de microcentrífuga e mantidos em bloco aquecido (35-36°C) durante a análise da cinética espermática. A análise computadorizada foi efetuada por meio do HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12, EUA, para mensuração da motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), amplitude lateral de cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento de cauda (BCF, Hz) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %). Foram mensurados quatro campos aleatórios, sendo avaliados no mínimo 1000 células por amostra.

### **Análise da integridade e funcionalidade da célula espermática**

Para a avaliação morfológica foram utilizadas sondas fluorescentes, conforme metodologia descrita por Celeghini et al. (19). Assim foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; 28,707-5, Sigma-aldrich Inc.) para integridade de membrana plasmática (IMP, %), FITC-PSA (L-0770, Sigma-aldrich Inc.) para integridade de membrana acrossomal (IMA, %) e JC-1 (T3168, Molecular Probes®, Invitrogen Co.) para alto potencial mitocondrial (APM%). Após a análise computadorizada, 20  $\mu\text{L}$  de sêmen foi adicionado aos criotubos contendo 3  $\mu\text{L}$  de IP (0,5 mg/mL em PBS), 6  $\mu\text{L}$  de JC-1 (153  $\mu\text{M}$  em dimetil sulfoxido) e 50  $\mu\text{L}$  de FITC-PSA (100 g/mL em PBS). Decorridos 8 minutos de incubação, a 37°C, uma alíquota de 7  $\mu\text{L}$  foi depositada sobre lâmina e lamínula, e as análises efetuadas em microscópio de epifluorescência (Leica, Alemanha) ao aumento de 1000x. Um total de 200 células foi contado de cada amostra.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System Institute Inc. 1998). Para todas as variáveis dos parâmetros espermáticos estudados realizou-se o cálculo das médias e desvio padrão e análise de variância seguida por teste de Tukey com nível de significância quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

De acordo com os dados mostrados na Tabela 1, houve diferença estatística para a VSL, sendo C e G2 diferentes de G1 e para VCL sendo C diferente de G1 e G2 semelhante a ambos. Os demais parâmetros (MT, MP, RAP, VAP, ALH, BCF, STR e LIN) não apresentaram diferença estatística.

Os dados de avaliação das amostras, pela microscopia de epifluorescência, são mostrados na Tabela 2. Não houve diferença significativa para IMA. Para IMP ocorreu diferença no G2 em relação ao demais (C e G1), e, para APM houve diferença entre C e G1, entretanto G2 foi semelhante a ambos.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da cinética espermática após análise computadorizada de 20 amostras de sêmen sexado bovino submetidas a diferentes protocolos de refrigeração antes da congelação.

	C	G1	G2
MT	56,7 ± 13,9	55,1 ± 1,0	61,9 ± 13,2
MP	32,8 ± 12,6	33,5 ± 14,6	37,7 ± 12,7
RAP	50,7 ± 15,2	46,1 ± 18,9	53,6 ± 16,8
VAP	109,4 ± 27,0	102,0 ± 16,0	113,2 ± 11,7
VSL	89,7 ± 10,4 <sup>a</sup>	82,3 ± 10,7 <sup>b</sup>	90,5 ± 7,2 <sup>a</sup>
VCL	206,6 ± 32,9 <sup>a</sup>	183,0 ± 33,4 <sup>b</sup>	194,2 ± 27,0 <sup>ab</sup>
ALH	8,0 ± 1,3	7,7 ± 1,2	7,8 ± 1,2
BCF	24,3 ± 3,4	24,7 ± 3,1	24,2 ± 3,6
STR	79,8 ± 5,2	81,8 ± 4,6	80,6 ± 6,1
LIN	45,6 ± 5,4	47,5 ± 5,1	48,6 ± 5,8

MT=Motilidade espermática total (%); MP=Motilidade espermática progressiva (%); RAP=Espermatozoides com movimento rápido (%); VAP=Velocidade de trajeto (µm/s); VSL=Velocidade linear (µm/s); VCL=Velocidade curvilínea (µm/s); ALH=Amplitude do batimento de cabeça (µm); BCF=Freqüência de batimento de cauda (Hz); STR=Retilinearidade (%); LIN=Linearidade (%).

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de diferentes letras na linha, diferem significativamente pelo método de Tukey (p < 0,05).

Controle (C): meio de manutenção sem glicerol e refrigeração a 5°C.

Grupo 1 (G1): meio de manutenção sem glicerol e refrigeração a 18°C.

Grupo 2 (G2): meio de manutenção com glicerol e refrigeração a 5°C.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão para os parâmetros de integridade e funcionalidade das células espermáticas avaliadas através de microscopia de epifluorescência pós-descongelamento de 20 amostras submetidas a diferentes protocolos de refrigeração para congelamento de sêmen sexado bovino.

	C	G1	G2
Integridade de membrana plasmática (%)	39,4 ± 10,5 <sup>a</sup>	41,6 ± 6,1 <sup>a</sup>	34,7 ± 6,6 <sup>b</sup>
Integridade de membrana acrossomal (%)	71,2 ± 9,8	73,1 ± 8,9	70,8 ± 8,6
Alto potencial mitocondrial (%)	62,6 ± 20,6 <sup>a</sup>	47,5 ± 13,8 <sup>b</sup>	51,1 ± 19,4 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de diferentes letras na linha, diferem significativamente pelo método de Tukey (p < 0,05).

Controle (C): meio de manutenção sem glicerol e refrigeração a 5°C.

Grupo 1 (G1): meio de manutenção sem glicerol e refrigeração a 18°C.

Grupo 2 (G2): meio de manutenção com glicerol e refrigeração a 5°C.

## DISCUSSÃO

De acordo com Verstegen et al. (20) valores maiores de VCL demonstram uma menor eficiência da movimentação espermática, já que ocorre um maior gasto de energia com um deslocamento curvilíneo em relação ao linear para uma mesma distância percorrida pelo espermatozóide. Os valores das velocidades VSL e VCL foram menores para o G1 em relação aos demais, demonstrando diferença no padrão da cinética espermática entre as metodologias e curvas de refrigeração utilizadas sugerindo uma melhora na proteção celular, devido a uma curva de refrigeração mais lenta, inicialmente, e rápida apenas após a adição de glicerol, o que

pode ter evitado a ocorrência de choque térmico. Rath et al. (16) desenvolveram uma metodologia denominada Sexcess®, na qual uma das modificações é a refrigeração em três etapas, procedimento que promoveu uma maior longevidade das células espermáticas.

No grupo G2 o meio de manutenção, com a presença de glicerol, expôs as primeiras células pós-separação a altas taxas de pressão osmótica, proporcionando-as um ambiente inadequado para sua manutenção, o que contribuiu para menores valores da IMP em relação aos demais grupos. Alvarenga et al. (21) expuseram os espermatozoides equinos a altas pressões osmóticas (1 M) com diferentes crioprotetores, por 10 minutos e, em seguida, um retorno à isosmolaridade, verificando que os espermatozoides do grupo com glicerol foram os que mais apresentaram injúrias, após tal procedimento.

O glicerol apresenta um efeito deletério sobre a sobrevivência do espermatozoide e concentrações acima de 10% são deletérias para o sêmen bovino (22). Com o decorrer do processamento, no grupo G2, a pressão osmótica foi diminuindo gradativamente devido à solução proveniente do citômetro de fluxo que contém os espermatozoides, apresentando, no final, uma osmolaridade próxima da espermática; o ambiente no meio de manutenção do G2 tornou-se mais adequado à preservação dos espermatozoides até o momento da refrigeração.

A adição do glicerol em concentrações adequadas, 600 a 700 mM, após o período de separação espermática, imediatamente antes do procedimento de refrigeração a 5°C, aliada a uma maior concentração de gema de ovo, poderia contribuir para a proteção espermática durante o procedimento de abaixamento de temperatura, sem exposição a altas pressões osmóticas indesejáveis para manutenção celular. Segundo Amirat et al. (23) as lipoproteínas presentes na gema de ovo auxiliam na proteção das membranas celulares durante a refrigeração, protegendo-as contra o choque térmico.

Outro indicador de melhora na proteção dos espermatozoides, com as mudanças na temperatura de refrigeração, foi o percentual de células com baixo potencial de membrana mitocondrial ocorrido no G1 em relação ao C. Nas células espermáticas as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares. Entretanto, o gasto de ATP deve ser equilibrado para que o espermatozoide possa mover-se no trato reprodutivo feminino, colonizar os reservatórios espermáticos e promover a fertilização (24).

A capacitação espermática leva a uma hiperpolarização das membranas espermáticas, incluindo a mitocondrial, devido ao aumento dos níveis de íons  $Ca^{++}$ . A base molecular do processo de capacitação espermática é a remoção de colesterol e alteração da distribuição dos fosfolípidos de membrana que resultam na abertura dos canais de  $Ca^{++}$  (25). Modificações semelhantes podem acontecer na crioinjúria, levando à ocorrência de uma capacitação espermática prematura. Este processo não é desejável, pois diminui a longevidade espermática (26).

Desta forma, o alto potencial de membrana mitocondrial encontrado no grupo C parece indicar que estes espermatozoides podem ter iniciado a capacitação espermática prematuramente. Estes dados podem ser reforçados pelo padrão de movimento espermático encontrado para VAP, VSL, VCL e ALH, os quais condizem com a hiperativação (20, 27, 28).

Apesar de não ter ocorrido melhora significativa nos parâmetros espermáticos avaliados, verificou-se que o procedimento de refrigeração inicial da célula espermática sexada é um ponto crítico no processo de congelação. Pequenas mudanças na composição do meio de manutenção e na curva de refrigeração mostraram alterações na cinética espermática.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, as três metodologias de refrigeração adotadas para a congelamento de sêmen sexado bovino apresentaram poucas variações. Assim novos estudos são necessários para aprimorar o procedimento de criopreservação de sêmen sexado bovino.

## REFERÊNCIAS

1. Seidel Jr GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 2002;124:711-4.
2. Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*. 2000;61:93-107.
3. Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 1999;52:1375-91.
4. Seidel Jr GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*. 2003;59:585-98.
5. Sartori R, Souza AH, Guinter JN, Caraviello DZ, Geizer LN, Schenk JL. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*. 2004;1:86-90.
6. Zhang M, Lu KH, Seidel Jr GE. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*. 2003;60:1657-63.
7. Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*. 2006; 65:943-57.
8. Garner DL, Seidel GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*. 2008;69:886-95.
9. Rath D, Ruiz S, Sieg B. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec*. 2003;152:400-1.
10. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan Y, Dekel I, Gacitua H. New trend in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;187:77-81.
11. Seidel Jr GE, Brink Z, Schenk JL. Use of heterospermic insemination with fetal sex as the genetic marker to study fertility of sexed sperm. *Theriogenology*. 2003;59:515.
12. Suh TK, Schenk JL. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology*. 2003;59:516.
13. Seidel Jr GE. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology and biology. *Anim Reprod Sci*. 2003;79:145-56.
14. Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1996;12:131-47.

15. Hammersted RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*. 1992;29:26-8.
16. Rath D, Moench-Tegeger G, Taylor U, Johnson LA. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*. 2009;71:22-9.
17. Rens W, Welch GR, Johnson LA. Improved flow cytometric sorting of X and Y-bearing sperm: substantial increase in yield of sexed semen. *Mol Reprod Dev*. 1999; 52:50-6.
18. Suh TK, Schenk JL, Seidel Jr GE. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*. 2005;64:1035-48.
19. Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CFR, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*. 2008;104:119-31.
20. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002;57:149-79.
21. Alvarenga MA, Papa, FO, Araujo GHM, Dell'Aqua Jr JA, Medeiros ASL. Osmotic stress of stallion sperm exposed to hypertonic solution of different cryoprotectants. *Reprod Domest Anim*. 2008;3:98.
22. Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: Fin GC, editor. *Oxford reviews of reproductive biology*. London: Oxford University Press; 1979. p.283-350.
23. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61:895-907.
24. Cosson JA. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int*. 1996;20:83-94.
25. Hernandez-Gonzales EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*. 2006;281:5623-33.
26. Collin S, Sirard MA, Dufour M, Bailey JL. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl*. 2000;21:938-43.
27. Yanagimaci R. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote*. 1994;2:371-2.
28. Ho HC, Suarez SS. An inositol 1,4,5-trisphosphato receptor-gated intracellular Ca<sup>++</sup> store is involved in regulating, and acrosome reactions. *Biol Reprod*. 2001;65:1606-15.

**Recebido em: 05/06/2009**

**Aceito em: 10/02/2011**