

## Seleção em gradiente de *Percoll*<sup>®</sup> sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado

*Selection bovine frozen semen in Percoll<sup>®</sup> gradient on spermatic parameters*

ZÚCCARI, Carmem Estefânia Serra Neto <sup>1</sup>; CARRIJO, Paula Rosa <sup>2</sup>; LEITE, Patrícia Arakaki <sup>2</sup>; SCALDELAI, Paulo Roberto Rojas <sup>2</sup>; RODOVALHO, Norma Cléa Mesquita <sup>3</sup>, ZANENGA, Carlos Alberto <sup>3</sup>; KIEFER, Charles <sup>1</sup>; SILVA, Eliane Vianna da Costa e <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Professor, Departamento de Zootecnia, FAMEZ / UFMS, Mato Grosso do sul, Brasil.

<sup>2</sup>Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária, FAMEZ / UFMS, Mato Grosso do sul, Brasil.

<sup>3</sup>Embriza Biotecnologia Ltda, Campo Grande, Mato Grosso do sul, Brasil.

<sup>4</sup>Professora, Departamento Medicina Veterinária, FAMEZ / UFMS, Mato Grosso do sul, Brasil.

\*Endereço para correspondência: zuccari@nin.ufms.br

### RESUMO

Na produção *in vitro* de embriões, técnicas de seleção espermática são usadas, dentre elas, o gradiente descontínuo de *Percoll*<sup>®</sup>. O objetivo foi avaliar a integridade da membrana plasmática (eosina-nigrosina), do acrossomo (*trypan blue*-Giemsa – TBG, lecitina do amendoim conjugada ao isotiocianato de fluoresceína associado ao iodeto de propídeo - Fitc-PNA/PI) e da cromatina (azul de toluidina), em espermatozóide bovino congelado. Vinte e nove amostras foram analisadas nos momentos pós-descongelamento (PD) e pós-*Percoll*<sup>®</sup> (PP). As variáveis expressas em porcentagem foram submetidas à análise de variância e foi empregado o teste de Tuckey para a comparação entre médias. O estudo da associação entre variáveis foi feito pelo teste de correlação de Pearson. Constataram-se, entre os momentos PD e PP, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a motilidade, integridade de membrana plasmática e número de espermatozoides vivos com acrossomo íntegro (TBG e Fitc-PNA/PI), com maiores valores obtidos PP. O percentual de células com alteração na condensação da cromatina não diferiu entre os momentos estudados. Conclui-se que o gradiente descontínuo de *Percoll*<sup>®</sup> foi eficaz na seleção de uma maior população de células móveis, com membranas plasmática e acrossomal íntegras, sem haver alteração na condensação da cromatina nuclear.

Palavras-chave: espermatozóide, *Percoll*<sup>®</sup>, touro

### SUMMARY

At *in vitro* embryo production sperm selection techniques are used, one of them is *Percoll*<sup>®</sup> density-gradient. The aim with this study was to evaluate the plasmatic membrane (eosin-nigrosin), acrosomal (*trypan blue*-Giemsa; fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin lecitin/propidium iodide (FITC-PNA/PI) and chromatin (toluidine blue) integrity, in frozen bovine spermatozoa. Twenty nine samples were analysed at post-thaw (PD) and post-*Percoll*<sup>®</sup> moments. Variable expressed in percentage were submitted to ANOVA and used Tuckey's test for mean comparison. The association between variables was made by Pearson's correlation. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) between moments for motility, plasmatic membrane integrity and number of live spermatozoa with intact acrosome (FITC-PNA/PI), with higher values for PP. The percentage of cells with chromatin alteration did not differed between moments. In conclusion, *Percoll*<sup>®</sup> density-gradient was efficient to select a higher population of motile cells with integral plasmatic and acrosomal membranes, without alterations in nuclear chromatin condensation.

Keywords: bull, *Percoll*<sup>®</sup>, spermatozoa

## INTRODUÇÃO

É crescente o uso das biotécnicas aplicadas à reprodução, como transferência (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIV). Para realizá-las, é utilizado o sêmen congelado, o que reforça a necessidade de uma seleção rigorosa dos touros quanto à fertilidade. A maneira mais precisa para se avaliar a fertilidade de um touro é a taxa de prenhez obtida após a monta natural, todavia, é um procedimento demorado e oneroso. Para a avaliação do sêmen criopreservado, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) preconiza a análise de alguns parâmetros espermáticos como motilidade, vigor, concentração e morfologia. Entretanto, variáveis consideradas isoladamente apresentam correlação muito variável com a fertilidade a campo (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). O espermatozóide (SPTZ) é uma célula complexa que necessita passar por processos fisiológicos para tornar-se apta à fecundação, dentre eles, se capacitar, desenvolver motilidade hiperativada, se ligar à zona pelúcida, sofrer a reação do acrossomo e se ligar ao oolema, apresentando, para isso, membrana plasmática, acrossomo e cromatina íntegros (GILLAN et al., 2006; YANAGIMACHI, 1994). Durante o transporte espermático no trato genital feminino, os gametas atravessam barreiras naturais, que selecionam aqueles aptos à fecundação do ovócito (SCOTT, 2000) e, da mesma forma, na PIV, também são necessários métodos que mimetizem esse processo (SOMFAI et al., 2002). Métodos como o *Percoll*<sup>®</sup> e Bovipure<sup>®</sup>, que permitem a preparação de gradientes descontínuos de densidade, a filtragem em coluna de gel de Sephadex, o *swim up* que conta com a migração ascendente das células móveis em uma solução e o *wash* que consiste da lavagem por centrifugação, são utilizados, previamente à fecundação *in vitro*, para selecionar uma

população espermática que possua maior número de células móveis e morfologicamente normais, além de remover componentes do diluidor, debris celulares e agentes infecciosos (HENKEL & SCHILL, 2003; HALLAP et al., 2004). O *Percoll*<sup>®</sup> é composto por partículas de sílica com 15 a 30 nm de diâmetro, recobertas com polivinilpirrolidona (SAMARDZIJA et al., 2006b). O gradiente descontínuo de *Percoll*<sup>®</sup> é uma das técnicas mais difundidas na PIV de animais, sendo esse um meio comercial que é preparado em diferentes densidades e que seleciona os espermatozóides através da centrifugação (PARRISH et al., 1995), com uma taxa de recuperação espermática ao redor de 50%, ou seja, cinco a dez vezes maior que aquela obtida após o *swim up* (AVERY & GREVE, 1995). Alguns resultados de pesquisa indicam que as técnicas de seleção espermática em gradiente de *Percoll*<sup>®</sup> (TANGHE et al., 2002) ou *wash* (SUZUKI et al., 2003), em geral, são mais eficazes na recuperação de células móveis, em especial, para o sêmen de touros de baixa fertilidade na PIV, quando comparados àqueles de alta fertilidade. O objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito da passagem do sêmen congelado de touros pelo gradiente descontínuo de *Percoll*<sup>®</sup> sobre a motilidade e a integridade das membranas plasmática, acrossomal e da condensação da cromatina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 29 amostras de sêmen congelado comercial de touros Nelore e as análises efetuadas nos momentos pós-descongelamento (PD) e pós-*Percoll*<sup>®</sup> (PP). As palhetas foram descongeladas por imersão em água a 37°C por 30 segundos. Preparou-se dois gradientes, a 90 e 45%, em meio Talp-sp, a partir do *Percoll*<sup>®</sup> comercial. Em tubo cônico de 15 mL, foram depositados 2 mL de *Percoll*<sup>®</sup> a

90% e, sobre ele, lentamente, o mesmo volume de *Percoll*<sup>®</sup> a 45%. O gradiente foi mantido em banho-maria até o momento do uso. Após a retirada das alíquotas para as análises pós-descongelamento, depositaram-se cerca de 400 µL de sêmen na porção superior do gradiente descontínuo de *Percoll*<sup>®</sup> e o material foi centrifugado a 700 G durante 30 minutos.

As amostras dos momentos PD e PP foram submetidas às análises de motilidade, integridade da membrana plasmática, *status* acrossomal e condensação da cromatina.

A avaliação da motilidade foi realizada, depositando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35 a 37°C), recoberta por lamínula. O exame foi realizado em microscópio de contraste de fase, em aumentos de 10 e 40x, e os valores da motilidade foram expressos em porcentagem (0 a 100).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática (MP), foi usada a coloração com eosina/nigrosina (EN), onde alíquotas de 10 µL de sêmen foram adicionadas a 10 µL da solução corante (BARTH & OKO, 1989). Foi confeccionado o esfregaço e, sob imersão em microscopia de campo claro, os espermatozoides com membrana plasmática lesada foram corados em rosa, classificados como mortos (EN-M). As células vivas (EN-V) não se coraram, sendo a visualização possível pelo contraste dado pela nigrosina. Células coradas pela eosina apenas na região pós-acrossomal foram consideradas mortas.

Na avaliação do *status* acrossomal, foram usados dois métodos. O de dupla coloração supravital com *trypan blue*-Giemsa (TBG), descrito por Didion et al. (1989), em que foram contadas 200 células, sob imersão em microscopia de campo claro, sendo os espermatozoides classificados nas seguintes categorias: 1) vivos – não corados na região pós-acrossomal e acrossomo rosa (TBG-V); 2) mortos – corados em azul na região pós-

acrossomal e acrossomo rosa (TBG-M); 3) reação acrossomal verdadeira – não corados na região pós-acrossomal e ausência de acrossomo (TBG-RAV); 4) reação acrossomal falsa – corados em azul na região pós-acrossomal e ausência de acrossomo (TBG-RAF).

Outro método de avaliação do *status* acrossomal usado foi da associação dos fluorocromos FITC-PNA com o iodeto de propídeo, de acordo com metodologia descrita por Nagy et al. (2003). Foram contadas 100 células, sob microscopia de epifluorescência alternada com campo claro, classificadas nas seguintes categorias: 1) vivos – células não coradas e vistas apenas sob microscopia de campo claro (FITC-PNA-V); 2) mortos – SPTZ com núcleo vermelho (FITC-PNA-M); 3) reação acrossomal verdadeira – SPTZ emitindo fluorescência verde apenas no acrossomo (FITC-PNA-RAV); 4) reação acrossomal falsa – SPTZ emitindo fluorescência verde na região acrossomal e núcleo vermelho (FITC-PNA-RAF).

A avaliação da condensação da cromatina foi feita através do método do azul de toluidina (AT), descrito por Beletti & Mello (1997). Foram contadas 500 células sob imersão em microscopia de campo claro, sendo classificadas de acordo com as variações de cor apresentadas no núcleo: 1) cabeças coradas em azul claro – cromatina íntegra (AT-I); 2) cabeças coradas em azul escuro / violeta ou magenta – falha na condensação da cromatina (AT-L).

Utilizando-se o programa estatístico SAS (1996), as variáveis expressas em porcentagem foram submetidas à análise de variância, considerando-se, como variáveis dependentes, os parâmetros de qualidade do sêmen e, variáveis independentes, os momentos. A comparação entre médias foi feita pelo teste de Tukey (SAMPALIO, 1998). Para o estudo da associação entre variáveis espermáticas, foi usado o teste de correlação de Pearson.

## RESULTADOS

A motilidade e o número de EN-V aumentaram significativamente após a passagem pelo gradiente de *Percoll*<sup>®</sup>. Todas as categorias do TBG apresentaram diferença significativa entre os momentos estudados, sendo o número de TBG-V, TBG-RAV e TBG-RAF maior no momento PP, enquanto a porcentagem de células mortas decresceu. Na avaliação do *status* acrossomal, pelo FITC-PNA, a porcentagem de espermatozóides vivos aumentou e a de células mortas e RAF apresentaram menor PP, em comparação ao PD. O número de reações acrossomais

verdadeiras não diferiu entre os momentos. Não houve diferença significativa entre os momentos para o percentual de células com falha na condensação da cromatina (Tabela 1). Não houve correlação entre as categorias de RAV e RAF para as técnicas do TBG e FITC-PNA/PI. A correlação significativa de média intensidade foi obtida entre as variáveis motilidade vs EN-V ( $r = 0,38$ ) e, para a categoria de mortos ( $r = 0,37$ ), entre TBG e FITC-PNA/PI. A correlação de alta intensidade ( $r = 0,69$ ;  $p < 0,05$ ) foi observada para a categoria de vivos entre as técnicas do TBG e FITC-PNA/PI.

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de motilidade, integridade da membrana plasmática, *status* acrossomal e alteração na condensação da cromatina, para o sêmen de touros Nelore ( $n = 29$ ), nos momentos pós-descongelamento e pós-*Percoll*<sup>®</sup>

Variáveis (%)	Tratamentos	
	Pós-descongelamento	Pós- <i>Percoll</i> <sup>®</sup>
Motilidade	18,92 $\pm$ 6,85 <sup>a</sup>	55,35 $\pm$ 9,22 <sup>b</sup>
EN – Vivos	64,22 $\pm$ 11,18 <sup>a</sup>	73,45 $\pm$ 11,16 <sup>b</sup>
TBG – Vivos	58,23 $\pm$ 9,24 <sup>a</sup>	63,26 $\pm$ 11,34 <sup>b</sup>
TBG – Mortos	34,0 $\pm$ 6,93 <sup>a</sup>	24,65 $\pm$ 9,11 <sup>b</sup>
TBG – RAV	1,32 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	3,04 $\pm$ 2,12 <sup>b</sup>
TBG – RAF	6,52 $\pm$ 4,32 <sup>a</sup>	9,04 $\pm$ 5,08 <sup>b</sup>
FITC-PNA – Vivos	40,44 $\pm$ 10,51 <sup>a</sup>	52,96 $\pm$ 12,89 <sup>b</sup>
FITC-PNA – Mortos	14,31 $\pm$ 5,56 <sup>a</sup>	10,93 $\pm$ 4,39 <sup>b</sup>
FITC-PNA – RAV	12,82 $\pm$ 11,88 <sup>a</sup>	13,34 $\pm$ 10,42 <sup>a</sup>
FITC-PNA – RAF	33,55 $\pm$ 10,87 <sup>a</sup>	22,79 $\pm$ 10,6 <sup>b</sup>
AT – Lesados	3,15 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	2,66 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>

\*letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Tuckey ( $p < 0,05$ )

EN – eosina/nigrosina; TBG- *trypan blue*-Giemsa; FITC-PNA – isotiocianato de fluoresceína conjugada a aglutinina do amendoim; RAV - reação acrossômica verdadeira; RAF – reação acrossômica falsa; AT - azul de toluidina.

## DISCUSSÃO

Embora vários métodos possam ser usados para se avaliar a qualidade de uma amostra de sêmen, a avaliação subjetiva da motilidade é o procedimento mais utilizado (CHRISTENSEN et al., 2005). Esse parâmetro é um bom indicador da

viabilidade espermática e de relevância para a fecundação, entretanto, não é o melhor indicador de fertilidade (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002). Assim, como observado no presente trabalho, diversos autores obtiveram maior motilidade após a passagem do sêmen pelo *Percoll*<sup>®</sup>, em comparação à pós-descongelamento

(PARRISH et al., 1995; SAMARDZIJA et al., 2006ab; CESARI et al., 2006). Contudo, em ovinos, a passagem do sêmen congelado pelo *Percoll*<sup>®</sup> aumentou a porcentagem de móveis (VALCÁRCEL et al., 1997), mas para o sêmen a fresco de caprinos essa diferença não foi observada (PALOMO et al., 1999). Para o sêmen humano a fresco os resultados são discrepantes, pois Centola et al. (1998) não verificaram diferença entre as avaliações de motilidade pré e pós-*Percoll*<sup>®</sup>, o mesmo não sendo relatado por Chen & Bongso (1999). Tanghe et al. (2002) obtiveram boa associação entre porcentagem de móveis pós-descongelamento e formação de pró-núcleo ( $R^2 > 0,50$ ), mas não houve correlação entre motilidade pós-*Percoll*<sup>®</sup> e formação de pró-núcleo.

De acordo com estudo retrospectivo de Graham (2001), as correlações entre fertilidade e apenas um atributo do sêmen congelado de touros variam consideravelmente entre estudos, sendo que os coeficientes para integridade da membrana plasmática variam de 0,33 a 0,66. Samardzija et al. (2006a), comparando os métodos de seleção espermática Bovipure<sup>®</sup> e *Percoll*<sup>®</sup>, através do teste hiposmótico, observaram que, após a passagem no *Percoll*<sup>®</sup>, a porcentagem de células íntegras aumentou em média 15%, resultado semelhante ao do presente trabalho. Tanghe et al. (2002) observaram um aumento de 20% de células viáveis (eosina-nigrosina) pós-*Percoll*<sup>®</sup>, no sêmen bovino congelado, independentemente do nível de fertilidade do touro. Os autores obtiveram alta correlação ( $r = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ) entre número de células íntegras após a PIV e a taxa de formação de pró-núcleos, confirmando que a integridade da MP é essencial para a fecundação. Tartaglione e Ritta (2004) correlacionaram ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ) a fertilidade *in vitro* com a integridade da MP avaliada pela associação da EN ao teste hiposmótico. Quando os mesmos foram empregados separadamente, não demonstraram ser bons estimadores da

fertilidade, concluindo os autores que testes que avaliam simultaneamente a integridade estrutural e atividade bioquímica da MP explicam melhor a variação nos resultados da PIV.

A capacitação seguida da reação acrossomal são requisitos fundamentais para que espermatozoides de mamíferos possam fecundar. Para isso, são necessários uma membrana plasmática e acrossomo intactos para que o SPTZ se ligue à zona pelúcida (KITIYANANT et al., 2002). Comparando a eficiência das técnicas do *swim up* e *Percoll*<sup>®</sup>, Somfai et al. (2002) verificaram que ambas aumentaram significativamente a proporção de células vivas, avaliadas pelo TBG, porém obtiveram maior taxa de recuperação espermática e maior percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras, pós-*Percoll*<sup>®</sup>. Orro (2007), trabalhando com sêmen bovino congelado, observou maior percentual de células vivas com acrossomo intacto pela técnica do TBG (58,8%), quando comparada ao método FITC-PNA/PI (41,6%), resultado semelhante ao obtido no presente estudo. Segundo Cross & Meizel (1989), essa discrepância pode se dever ao fato de os corantes fluorescentes serem mais sensíveis, produzirem maior intensidade de contraste e não gerarem ambiguidade à interpretação, como ocorre com o *trypan blue*-Giemsa.

No presente trabalho, o número de espermatozoides mortos foi maior pelo método do TBG, em comparação ao FITC-PNA/IP, que apresentou mais células na categoria da RAF. Isso pode ser explicado pela dificuldade e maior subjetividade que há para se diferenciar o *status* acrossomal quando utilizado TBG, o mesmo não acontecendo com as sondas fluorescentes FITC-PNA/IP (KITIYANANT et al., 2002). Samardzija et al. (2006b) observaram alta correlação entre o *status* acrossomal e a produção embrionária ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). Tartaglione & Ritta (2004) relatam que os resultados obtidos através do TBG, quando associados àqueles do teste hiposmótico com

EN, explicaram 82,4% da variação na taxa de PIV. Isso pode ser justificado pelo fato de os espermatozoides com acrossomo intacto, muito possivelmente, não estarem capacitados. Larsson & Martinez (2000), em artigo de revisão, relatam que o touro influencia nos resultados de fecundação e cultivo *in vitro* de embriões, o que levou vários pesquisadores a investigarem se existe correlação entre fertilidade *in vivo* e *in vitro*. As variáveis analisadas nesses estudos foram a taxa de clivagem, desenvolvimento até o estágio de mórula ou blastocisto, testes de penetração ovocitária e formação de pró-núcleos.

A cromatina espermática é uma estrutura complexa e altamente organizada, que protege o DNA para que ocorra a transmissão precisa da informação genética às gerações futuras. Anormalidades no DNA resultam em infertilidade do macho, com decréscimo progressivo da fertilidade quando mais de 30% das células espermáticas apresentam lesões (AGARWAL & SAID, 2003). Para Madrid-Bury (2005), a taxa de concepção depende, dentre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática em se descondensar e formar o pró-núcleo masculino. Já a baixa estabilidade da cromatina, encontrada em touros com baixa taxa de não-retorno ao cio, pode ocorrer por anormalidades relacionadas à baixa fertilidade intrínseca ou a uma alta suscetibilidade à congelação.

De acordo com alguns estudos (FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001; SAILER et al., 1996), a integridade da cromatina tem correlação significativa com alterações morfológicas, principalmente, a cabeça piriforme e estreito na base. Beletti et al. (2004) relatam que, segundo resultados de análises através da coloração com AT, diferenças entre touros podem ser observadas após a criopreservação, mesmo com fertilidade semelhante a campo, o que pode ser explicado por danos na cromatina, em células morfológicamente normais ou não. No

presente trabalho, foram usadas doses provenientes de centrais de colheita e processamento de sêmen, portanto, pré-selecionadas para alguns parâmetros espermáticos, inclusive morfológico, uma possível explicação para a baixa incidência de cromatina lesada observada pós-descongelação, a qual também não sofreu influência da passagem pelo gradiente de *Percoll*<sup>®</sup>.

A técnica de seleção espermática ideal deve ser de rápida execução, ter custo acessível, isolar a maior concentração possível de gametas, não causar danos estruturais nem alterações fisiológicas nas células selecionadas, eliminar espermatozoides mortos e outros tipos celulares como leucócitos ou bactérias e remover substâncias bioativas, como os fatores decapacitantes, ou tóxicas como as espécies reativas ao oxigênio (ROS) (HENKEL & SCHILL, 2003).

Quando o gradiente de *Percoll*<sup>®</sup> é comparado ao método clássico do *swim up*, fica evidente sua superioridade, pois, embora o *swim up* tenha como vantagens ser de fácil execução, baixo custo e recuperar amostras límpidas e com espermatozoides com alta motilidade, tem como principal desvantagem apresentar baixa taxa de recuperação e, por essa razão, só pode ser usado para amostras com alta concentração de células (PARRISH et al., 1995), além de provocar lesões maciças pelas ROS, levando a uma redução significativa do percentual de espermatozoides com condensação normal da cromatina (HENKEL & SCHILL, 2003). Evenson & Jost (2000), em estudo com humanos, touros, garanhões e cachacos, relataram que, quando o sêmen é submetido a técnicas de seleção como o *swim-up*, há o aumento da porcentagem de células móveis e remoção das mortas, mas, se = 27% dos espermatozoides estiverem com DNA lesado, há infertilidade.

Estudos compararam a eficiência do *Percoll*<sup>®</sup> com a de outros métodos de seleção espermática (*wash* e *swim up*), sobre algumas variáveis, como as taxas de

penetração de ovócitos, de formação de pró-núcleos, de clivagem e de formação de blastocisto. A seleção em gradiente de Percoll<sup>®</sup> se mostrou igual, ou superior, aos demais procedimentos (DODE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; CESARI et al., 2006; SEIDEL et al., 1995; SAMARDZIJA et al., 2006b).

Em síntese, o gradiente de Percoll<sup>®</sup> atende a maior parte dos quesitos de uma técnica eficaz para seleção espermática, e, além disso, resulta em frações límpidas, com espermatozoides de alta motilidade, reduz significativamente as ROS, não causa lesões na cromatina, elimina leucócitos e proporciona uma alta taxa de recuperação de gametas, mesmo quando amostras com baixa concentração espermática são usadas.

Conclui-se que a passagem pelo gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi eficaz na seleção de uma maior população de espermatozoides móveis, com membranas plasmática e acrossomal íntegras, sem provocar alterações na condensação da cromatina nuclear.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction**, v.9, n.4, p. 331-345, 2003.

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of percoll<sup>®</sup> on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State Ames: University Press, 1989. 285p.

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

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Testicular and semen alteration after three days of

experimental cryptorchidism in rabbit.

**Brazilian Journal of Morphology Science**, v.14, p.88, 1997.

CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v.66, p.1185-1193, 2006.

CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K.M.; KORSGAARD, I.R.; JENSEN, J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. **Journal of Andrology**, v.26, p.98-106, 2005.

CENTOLA, G.M.; RITA HERKO, A.A.S.; ANDOLINA, B.S.E.; WEISENSEL, B.S.S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.70, p.1173-1175, 1998.

CHEN, M.J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, v.14, p.759-764, 1999.

CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1996. 65p.

CROSS, N.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v.41, p.635-641, 1989

DIDION, B. A.; DOBRINSKI, J. R.; GILES, J. R.; GRAVES, C. N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v.22, p.51-57, 1989.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time

on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-23, 2002.

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

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2006.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 3., 2001, Fort Collins. **Anais...** Fort Collins: Colorado State University, 2001. 88p.

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; MARTINEZ, H. R. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, p. 702-13, 2004.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. In: HENKEL, R.R.; SCHILL, W. B. **Reproductive biology and endocrinology**. 2003. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/1/1/108>>. Acesso em: 02 maio 2008.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinary and Zootech**, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

KITIYANANT, Y.; CHAISALEE, B.; PAVASUTHIPASIT, K. Evaluation of the acrossome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. **International Journal of Andrology**, v.25, p.215-222, 2002.

LARSSON, B.; RODRÍGUES-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60, p.327-336, 2000.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; SANJUANBENITO, B.P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MARTÍNEZ, J.L. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.232-241, 2005.

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

ORRO, I.R. **Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e do acrossomo do espermatozóide criopreservado de touros**. 2007. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande.

OSTERMEIER, G.C. Measurements of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.584-594, 2001.

PALOMO, M.J.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of semen preparation on FIV of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.927-940, 1999.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.312-318, 2003.

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

SAMARDZIJA M.; KARADJOLE, M.;  
GETZ, I.; MAKEK, Z.; CERGOLJ, M.;  
DOBRANIC, T. Effects of bovine  
spermatozoa preparation on embryonic  
development in vitro. **Reproductive Biology  
Endocrinology**, v.58, p.237-247, 2006a.

SAMARDZIJA M.; KARADJOLE M.;  
MATKOVIC M.; CERGOLJ M.; GETZ I.;  
DOBRANIC T.; TOMASKOVIC A.;  
PETRIC J.; SURINA J.; GRIZELJ J.;  
KARADJOLE T. A comparison of bovipure®  
and percoll® on bull sperm separation protocols  
for IVF. **Animal Reproduction Science**, v.91,  
p.237-247, 2006b.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à  
experimentação animal**. Belo Horizonte:  
Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina  
Veterinária, 1998. 221p.

SAS INSTITUTE – SAS. **Statistical Analysis  
System**: version 6, 4. ed. Cary, 1996. 1686 p.

SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in  
vivo: sperm transport and epithelial interaction  
in the female reproductive tract. **Animal  
Reproduction Science**, v. 60-61, p.337-348,  
2000.

SEIDEL, G.E.; LEIPOLD, S.D.; SHAWKI,  
H. Preparation of bovine sperm for in vitro  
fertilization by swim up or centrifugation  
through Percoll or BSA. **Theriogenology**,  
v.43, p.319, 1995.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP,  
A.B.; IVÁNCICS, J.; BARANYAI, B.;  
GÓCZA, E.; KOVÁCS, A. Effect of swim up  
and Percoll treatment on viability and  
acrossome integrity of frozen-thawed bull  
spermatozoa. **Reproduction Domestic  
Animal**, v.37, p.285-290, 2002.

SUZUKI, K.; GESHI, M.; YAMAUCHI, N.;  
NAGAI, T. Functional changes and motility  
characteristics of Japanese Black Bull  
spermatozoa separated by Percoll. **Animal  
Reproduction Science**, v.77, p.157-172,  
2003.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N.  
Prognostic value of spermatological  
parameters as predictors of in vitro fertility of  
frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**,  
v.62, p.1245-1252, 2004.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKY,  
V.; MAES, D.; KRUIF, A. Assessment of  
different sperm quality parameters to predict in  
vitro fertility of bulls. **Reproduction  
Domestic Animal**, v.37, p.127-132, 2002.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M.A., PÉREZ,  
L.; MOSES. D.F.; BALDASARRE, H.  
Assessment of the acrosomal status of  
membrane-intact ram spermatozoa after  
freezing and thawing, by simultaneous  
lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal  
Reproduction Science**, v.45, p.299-309,  
1997.

YANAGIMACHI, R. Mammalian  
fertilization. In: KNOBILL, E., NEIL, J.D.  
(Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed.  
New York: Raven Press, 1994. p. 189-317.

Data de recebimento: 18/11/2007

Data de aprovação: 19/05/2008