

## Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos

*Alteration of sex ratio and DNA integrity of bovine sperm centrifuged in continuous density gradients*

RESENDE, Max Vitória<sup>1\*</sup>; LÚCIO, Aline Costa de<sup>1</sup>; PERINI, Ana Paula<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Letícia Zoccolaro<sup>1</sup>; ALMEIDA, Adriana Oliveira de<sup>1</sup>; GUSMÃO, Alberto Lopes<sup>2</sup>; LIMA, Vera Fernanda Martins Hossepian de<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador, Bahia, Brasil.

\*Endereço para correspondência: mvresende@yahoo.com.br

### RESUMO

O objetivo, neste trabalho, foi verificar o desvio da proporção de sexo e a presença de fragmentação do DNA, pela técnica de TUNEL (“In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay”), em espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade de Percoll ou OptiPrep durante a separação espermática. Doses de sêmen de touros foram descongeladas, e cerca de 40 milhões de espermatozoides foram depositados sobre cada gradiente de densidade compostos por Percoll ou OptiPrep com três camadas entre 1.110g/mL e 1.123g/mL, em tubos de 15mL, em que permaneceram por 24h a 4°C antes da deposição dos espermatozoides. Os tubos foram centrifugados a 500xg por 15min a 22°C. Os sobrenadantes foram aspirados, e os sedimentos, recuperados para verificação da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL. Obteve-se um desvio dos embriões produzidos *in vitro* para fêmeas no gradiente de Percoll (62% de fêmeas), em relação aos grupos OptiPrep e Controle (47,1 e 48,7% de fêmeas, respectivamente). Não foi detectada fragmentação do DNA dos espermatozoides nas amostras centrifugadas, tanto no gradiente de Percoll quanto de OptiPrep. Dessa forma, foi possível realizar a sexagem espermática, com uma maior porcentagem de espermatozoides X do que o grupo controle, por meio de metodologia mais simples e sem provocar danos ao DNA dos espermatozoides.

**Palavras-chave:** sexagem de espermatozoides, centrifugação, sêmen, TUNEL

### SUMMARY

The objective of the present study was to verify the sex ratio and presence of DNA fragmentation by TUNEL technique (In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) in bovine spermatozoa centrifuged in density gradients of Percoll or OptiPrep during the sperm separation. Approximately 40 million of frozen/thawed bovine spermatozoa were deposited on each density gradient composed of Percoll or OptiPrep with three layers ranging from 1.110g/mL to 1.123g/mL in polystyrene tubes of 15mL. The tubes were kept at 4°C for 24h before the deposition of sperm. Centrifugation of the tubes was performed at 500xg for 15min at 22°C. Supernatants were aspirated and the sediment recovered for verification of DNA fragmentation by TUNEL technique. A deviation of *in vitro* produced embryos for females in Percoll gradient (62% females) was obtained in relation to OptiPrep and Control groups, (47.1 and 48.7% of females, respectively). No sperm DNA fragmentation was detected in centrifuged samples (Percoll or OptiPrep gradients). Thus, it was possible to sexing sperm, obtaining a higher percentage of X sperm than the control group, using a methodology that is simple and without damage to the sperm DNA.

**Keywords:** bovine, sperm sexing, centrifugation, semen, TUNEL

## INTRODUÇÃO

A partir de 1910, com a descoberta dos cromossomos sexuais X e Y, a pré-seleção do sexo seguiu um direcionamento científico e, no decorrer dos anos posteriores, muitos métodos foram pesquisados para a separação das duas populações de espermatozoides, mas suas eficiências não foram confirmadas em estudos posteriores (SEIDEL JÚNIOR, 2007). Até o momento, as técnicas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides X e Y são as únicas validadas cientificamente (GARNER, 2006).

Uma dessas técnicas é a citometria de fluxo, em que se utiliza um equipamento munido de um “laser”, o qual é capaz de separar as duas populações de espermatozoides com uma acuidade de mais de 90%. No entanto, a mesma possui algumas desvantagens que limitam o seu emprego, dentre essas, o custo do equipamento e os danos provocados aos espermatozoides durante o processo de sexagem (SEIDEL JÚNIOR, 2003).

Por meio de uma metodologia bem mais simples, a centrifugação em gradiente de densidade é capaz de separar os espermatozoides X dos Y a um custo e demanda de tempo bem menores, apesar de uma acuidade menor (ao redor de 70%) à obtida na citometria de fluxo (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). Além disso, existe a necessidade de se verificar a ocorrência de danos aos espermatozoides que podem ocorrer durante a centrifugação. Para isso, podem ser realizados testes *in vivo*, como a utilização desses espermatozoides na inseminação artificial, ou testes *in vitro*, como, por exemplo, por meio de técnicas de coloração, taxa de clivagem e de

blastocisto durante a produção *in vitro* de embriões (RESENDE et al., 2009). Desse modo, o objetivo neste trabalho foi avaliar o desvio da proporção de sexo em espermatozoides bovinos e a viabilidade espermática pela determinação de fragmentação do DNA após a centrifugação em gradiente de densidade contínuo de Percoll ou OptiPrep.

## MATERIAL E MÉTODOS

As doses de sêmen bovino criopreservadas foram adquiridas de Empresas Especializadas em Criopreservação e Comercialização de Sêmen, de duas raças que possuem aptidão leiteira (Gir e Jersey), devido ao objetivo de separação de espermatozoides X proposto neste trabalho. Foram utilizados quatro touros, dois para cada raça, em que as doses de sêmen de cada um dos touros pertenciam à mesma partida. O sêmen dos diferentes touros e das raças não sofreu mistura.

Os gradientes de densidade contínuos de Percoll e OptiPrep foram feitos da seguinte forma:

O gradiente de Percoll foi preparado pela diluição em diferentes proporções, a solução estoque (SE) de Percoll™ (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), composta por Percoll a 90%, pH 7,4; 280-290mOsm/kg H<sub>2</sub>O), em meio DMEM concentrado 10X (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D7777) com 0,3% de BSA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha, 12659), 10mg/L de antibiótico sulfato de gentamicina e 6mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, H3375), com pH de 7,4 até a obtenção de densidades entre 1.110 e 1.123g/mL.

O gradiente de OptiPrep foi preparada pela diluição em diferentes proporções, o OptiPrep® (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D1556) em meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, D1152) com 0,3% de BSA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha, 12659), 10mg/L de antibiótico sulfato de gentamicina e 14,21mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA, H7006), pH 7,4 para obtenção de densidades entre 1.110 e 1.123g/mL. Não houve a necessidade de se fazer uma solução estoque, pois o OptiPrep é comercializado pronto para uso.

O gradiente de densidade de Percoll ou OptiPrep foi preparado com o depósito de cada uma das soluções de trabalho, com auxílio de um pipetador de repetição (repipetador), em tubos cônicos de poliestireno com capacidade para 15mL. Cada tubo com o gradiente de Percoll ou OptiPrep foi composto por três camadas de 3mL, com densidades entre 1.110 e 1.123g/mL. Os tubos foram mantidos a 4°C por 24h para conversão do gradiente descontínuo em gradiente contínuo, de acordo com as instruções contidas no manual de preparação de gradientes (DENSITY GRADIENT MEDIA, 2005)

As doses de sêmen de 0,25mL foram descongeladas a uma temperatura de 35°C por 20 segundos, com avaliação, em seguida, da motilidade, do vigor e da concentração espermática. A média de motilidade obtida pós-descongelação foi de 63%, com vigor de 3,5. A concentração foi determinada por meio de uma câmara de Neubauer, com o intuito de se verificar a quantidade total de espermatozoides a serem depositados nos gradientes de Percoll ou OptiPrep. Depositou-se, para cada gradiente, cerca de 40 milhões de espermatozoides e, posteriormente, esses gradientes foram centrifugados a 500xg em rotor horizontal, por 15 minutos, à temperatura

de 22 a 24°C. Em seguida, os sobrenadantes de todos os tubos foram retirados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, acoplada a uma bomba de sucção. Os sedimentos com os espermatozoides foram recuperados com a utilização de um pipetador automático e utilizados nos procedimentos de validação dos resultados da sexagem de espermatozoides pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) dos embriões produzidos *in vitro* e pela verificação da viabilidade espermática mediante técnica de TUNEL.

A produção de embriões *in vitro* com espermatozoides centrifugados nos gradientes de densidade de Percoll e OptiPrep e do grupo controle foi realizada da seguinte forma:

Os ovários bovinos coletados em abatedouros foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-35°C e seus folículos antrais de 3 a 8mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 19-gauge acoplada a uma seringa de 20mL. Foram selecionados apenas ócitos de *cumulus* compacto com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* e ooplasma de coloração uniforme. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) selecionados foram maturados em meio constituído por TCM-199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25mM de bicarbonato de sódio, 83,4µg/µL de sulfato de amicacina, 1µg/mL de estradiol, 1,0µg/mL de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, EUA), 50µg/mL de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) acrescido de 10% de SFB (Cripion, Andradina, Brasil). Foram transferidas 20 a 25 estruturas/microgota de 100µL, que permaneceram por 22 horas em estufa a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. A fecundação foi realizada 24 horas após o início do cultivo de maturação. No grupo controle, uma palheta de sêmen

foi descongelada à temperatura de 35°C por 30 segundos, e os espermatozoides vivos e móveis foram separados do diluidor por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll (45 e 90%), a 900xg, durante 30 minutos. No grupo centrifugado, o sedimento recuperado e enriquecido com espermatozoides X foi avaliado quanto ao volume, à concentração e à motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> espermatozoides vivos por mililitro de meio de fecundação TALP-FIV, suplementado com 6mg/mL de BSA, 30µg/mL heparina, 18µM penicilamina, 10µM hipotaurina, 1,8µM epinefrina, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. Aproximadamente 100x10<sup>3</sup> espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100µL de meio TALP-FIV designado para cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados três vezes em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 a 25 oócitos por gota de FIV e incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade saturada. Os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF sem adição de SFB e sem glicose, em placas com quatro poços com 500µL do meio. Foram cultivados aproximadamente 65 zigotos por poço, e as placas foram mantidas em uma câmara incubadora modular (Billups Rothenberg, Califórnia, EUA) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>, com umidade saturada, no interior de incubadora a 38,5°C. Em todas as repetições foi feito, concomitantemente, um grupo controle, que não foi submetido à centrifugação, para obter a proporção de sexo real de embriões machos e fêmeas durante o cultivo *in vitro*.

Após sete dias de cultivo, os embriões foram retirados do meio, lavados em PBS e depositados individualmente

em microtubos para PCR de 0,2mL com 10µL de água do Milli-Q autoclavada. Os microtubos, que continham um embrião cada, foram submersos em nitrogênio líquido, retirados posteriormente e armazenados em *freezer* até o momento da sexagem pela PCR.

Antes do procedimento de PCR, a cada microtubo que continha um embrião foram adicionados 5µL de Proteinase K (50µg/embrião), e foi realizada uma incubação por 60 minutos, a 37°C, por meio de um termociclador. Em seguida, a Proteinase K foi desnaturada a 98°C por 10 minutos. O conteúdo de cada tubo foi dividido em duas amostras (A e B) que, em seguida, foram submetidas à PCR.

O sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* foi identificado mediante dois pares de diferentes oligonucleotídeos iniciadores ("primers") que amplificam sequências específicas do cromossomo Y, presente no DNA genômico de bovinos do sexo masculino (XY), e um par de "primers" com o controle do DNA genômico dos bovinos. Os dois pares de "primers" escolhidos para a sequência específica do cromossomo Y foram: "Primer" 1 – senso: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e antisenso: 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3'; "Primer" 2 - senso: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e antisenso: 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'. O "primer" 1 amplifica uma sequência de 210pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI et al., 1989), e o "primer" 2 amplifica uma sequência de 196pb em machos (SCHWERIN et al., 1991).

Utilizou-se um "primer" específico para o DNA bovino: "Primer" 3 – senso 5' - AGG TCG CGA GAT TGG

TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e antisenso:  
5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'. Esse "primer" amplifica uma sequência de 280pb, repetida no genoma bovino (ELLIS et al., 1988). Os "primers" 1 e 3 foram utilizados na amostra A e o "primer" 2 foi utilizado na amostra B. As reações possuíam um volume final de 30µL (23µL do mix mais 7µL de DNA do embrião). O mix da PCR, para cada amostra, continha tampão 10X para PCR, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16mM de cada dNTP, 0,17µM de cada "primer" e 1 unidade de Taq Polimerase (Invitrogen, San Diego, EUA) e água do Milli-Q autoclavada. As amplificações foram efetuadas em termocicladores MJ Research PTC 100 (GMI Inc., Minnesota, USA) e Genius (Techne, Staffordshire, Reino Unido). As amostras foram submetidas à

seguinte sequência de ciclos: um ciclo inicial de desnaturação do DNA foi feito a 94°C por 4 minutos para as amostras A e B. As amostras A foram submetidas a 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C. As amostras B foram submetidas a 38 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C. Em todos os géis foram utilizados os controles: DNA de sangue de macho, DNA de sangue de fêmea e um negativo (branco), ao qual não foi adicionado DNA. Foi utilizado um padrão ("ladder") 100pb (Invitrogen, San Diego, EUA) para verificação do tamanho das bandas das amostras (Figura 1).

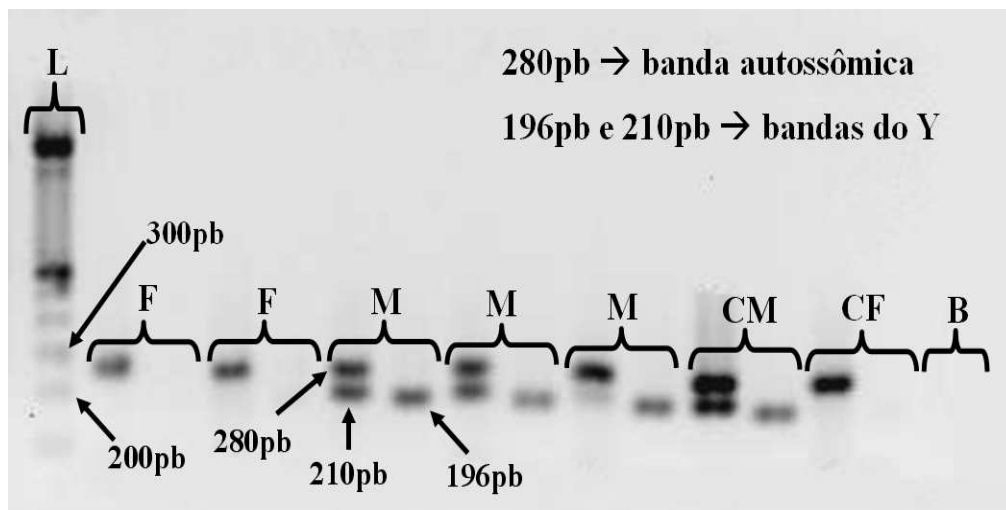


Figura 1. Representação de um gel de agarose a 2%, com os padrões de amplificação pela PCR de DNA de embriões bovinos produzidos *in vitro*, corado com brometo de etídio, o que representa os fragmentos com 280pb, 210pb e 196pb. Legenda: L ("ladder": 100pb, Invitrogen, San Diego, EUA), F (embrião fêmea), M (embrião macho), CM (controle com DNA de macho), CF (controle com DNA de fêmea) e B (branco – sem DNA)

Os resultados da proporção de sexo obtida a partir da identificação do sexo dos embriões nos grupos Percoll, OptiPrep e Controle foram submetidos ao teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

Uma fração do sêmen também foi colhida imediatamente após a centrifugação em gradiente de densidade, seguiu para a verificação da presença de danos no DNA desses espermatozoides pela técnica do TUNEL, com base no protocolo de Martins et al. (2007a), em que se utilizou o kit “In Situ Cell Death Detection”, com fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). As centrifugações para as lavagens dos espermatozoides foram realizadas a 1300xg por 5min. Inicialmente, os espermatozoides foram lavados com PBS-PVP (0,1%), e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso com paraformaldeído e mantido por 1h em temperatura ambiente, para fixação dos espermatozoides. Procedeu-se à nova lavagem com PBS-PVP (0,1%), e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, permeabilizou-se a amostra com uma solução composta de

0,5% de Triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio, por 1h em geladeira. Os espermatozoides foram lavados, em PBS-PVP (0,1%), e o sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 15µL do kit (1,5µL da enzima e 13,5µL de tampão), que foram mantidos na ausência de luz, a 37°C. Paralelamente, foram feitos o controle negativo (somente o tampão) e o controle positivo (enzima e tampão e uma solução de 20µL de DNase I (50UI/µL), por 30min em temperatura ambiente. Após esse período, os espermatozoides foram lavados com PBS-PVP (0,1%) e contracolorados por 30min em temperatura ambiente com 40µL de solução de Hoechst 33342 (1µg/µL) para visualização do DNA total.

Foram contadas pelo menos 100 células de cada amostra em microscópio de fluorescência não invertido. Os espermatozoides foram classificados como TUNEL positivos (com fragmentação do DNA) e negativos (sem fragmentação do DNA), quando a cabeça apresentava-se corada ou não em verde, respectivamente (Figura 2).

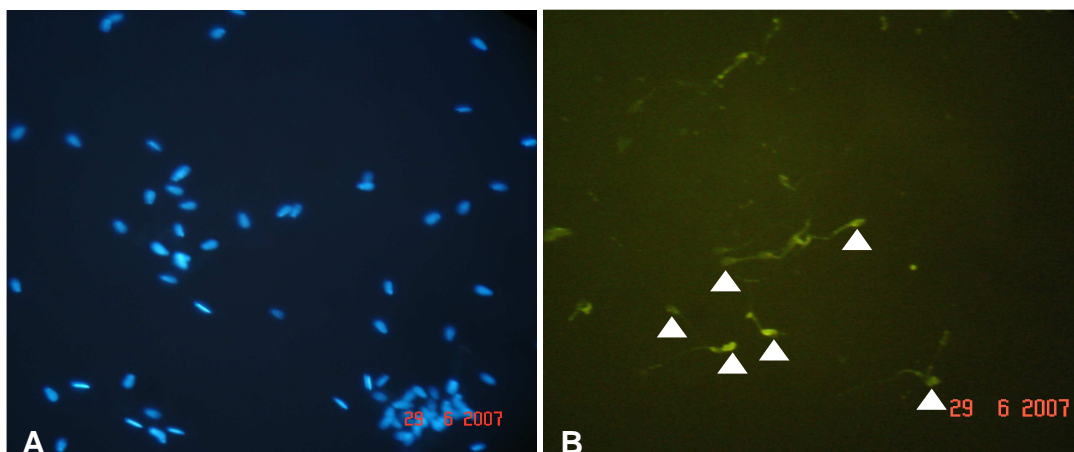


Figura 2. Espermatozoides submetidos à técnica de TUNEL para verificação de fragmentação de DNA, sob microscopia de fluorescência. A: espermatozoides mostrando DNA total. B: espermatozoides do controle positivo (adição de DNase) apresentando fragmentação de DNA, indicados pelas cabeças de seta. Fotografia digital com aumento de 1000X

O resultado final referiu-se à porcentagem de espermatozoides TUNEL positivos e foi comparado ao sêmen controle, que não foi submetido à centrifugação, e aos grupos dos gradientes de densidade de Percoll ou OptiPrep. Os grupos foram comparados entre si pelo teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a verificação do desvio da proporção do sexo para fêmeas, 772 embriões, produzidos *in vitro*, com a utilização de espermatozoides centrifugados nos gradientes de

densidade e o grupo controle, foram avaliados pela PCR. Desses embriões, 706 (91,45%) puderam ser sexados corretamente. Após a análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, observou-se que o gradiente de Percoll foi mais apropriado na separação dos espermatozoides X (Tabela 1), pois ocorreu um desvio da proporção de sexo ( $p < 0,05$ ), com obtenção de 62% de embriões fêmeas, em comparação com 48% de embriões fêmeas no grupo controle. No gradiente de OptiPrep, a porcentagem de fêmeas foi de 47,3%, o que não diferiu ( $p > 0,05$ ) do grupo controle. Não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) na proporção de sexo, quando foram comparadas as raças e os touros.

Tabela 1. Proporção de sexo obtida com embriões bovinos produzidos *in vitro* com espermatozoides sexados por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll ou OptiPrep e do grupo controle

Grupo	Total de embriões	Embriões machos n (% ± DP)	Embriões fêmeas n (% ± DP)
Percoll	221	84 (38,0 ± 3,02) <sup>b</sup>	137 (62,0 ± 3,02) <sup>a</sup>
OptiPrep	239	126 (52,7 ± 6,28) <sup>a</sup>	113 (47,3 ± 6,28) <sup>b</sup>
Controle	246	128 (52,0 ± 5,04) <sup>a</sup>	118 (48,0 ± 5,04) <sup>b</sup>
Total	706	-	-

DP = desvio padrão.

<sup>a,b</sup>Valores seguidos de letras diferentes nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Resultados de sexagem de espermatozoides bovinos recém-colhidos, com o uso de gradiente descontínuo de Percoll com 12 camadas, foram descritos na literatura com obtenção da seleção de espermatozoides X de 55,7% (KOBAYASHI et al., 2004) a 74,3% (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). No presente estudo, foram preparados gradientes de densidade com apenas três camadas e armazenados por um período

de 24h a 4°C. Esse procedimento pode facilitar a utilização de gradientes de densidade por empresas especializadas de criopreservação e comercialização de sêmen ou em empresas de produção *in vitro* de embriões, uma vez que os gradientes contínuos podem ser preparados antecipadamente, o que facilita os procedimentos de rotina nessas empresas. Contrariamente, os gradientes descontínuos, sejam eles compostos por poucas ou muitas camadas, devem ser utilizados pouco

tempo antes do procedimento de centrifugação, pois, caso contrário, ocorre a mistura das camadas, de maneira a descaracterizar o gradiente.

Não foram observadas fragmentações de DNA pela técnica de TUNEL, tanto nas amostras submetidas à centrifugação em gradiente de densidade de Percoll ou OptiPrep, quanto nas amostras do grupo controle (não submetidas à centrifugação). A fragmentação de DNA foi detectada somente no controle positivo da técnica, em que, propositadamente, induziu-se a quebra de DNA pela adição de DNase. Essa indução proposital de quebra do DNA dos espermatozoides contribuiu para a verificação da funcionalidade do kit utilizado neste trabalho.

Diversas técnicas para verificação da fragmentação de DNA têm sido utilizadas, rotineiramente, em humanos (BENCHAIIB et al., 2003; LARSON-COOK et al., 2003), em bovinos (BALLACHEY et al., 1988; MARTIN et al., 2004; MARTINS et al., 2007a,b) e em suínos (DE AMBROGI et al., 2006), para avaliar a viabilidade espermática e, conseqüentemente, a qualidade dos espermatozoides que serão utilizados.

Em espermatozoides, taxas de fragmentação do DNA maiores ou iguais a 30% estão correlacionadas a baixas porcentagens de gestação em humanos (BENCHAIIB et al., 2003; EVENSON & WIXON, 2006). Em bovinos, provocam diminuição da fertilidade do sêmen a campo (WATERHOUSE et al., 2006), bem como influenciam negativamente a produção *in vitro* de embriões (FATEHI et al., 2006). Devido à sua importância, a verificação de danos ao DNA torna-se necessária, principalmente quando técnicas que promovam a manipulação dos espermatozoides são propostas.

A despeito de existirem relatos na literatura de identificação da fragmentação do DNA com a técnica do TUNEL em espermatozoides bovinos (FATEHI et al., 2006; MARTINS et al., 2007a,b), neste estudo, não foi possível a identificação de espermatozoides TUNEL-positivos nos tratamentos. Nesse caso, pode-se inferir que não houve fragmentação do DNA de espermatozoides centrifugados nos gradientes de densidade do experimento, pois essa estratégia não causa lesões às células separadas. Em estudos anteriores, comprovou-se a existência de apenas 1% fragmentação de DNA em espermatozoides bovinos descongelados e centrifugados em gradiente de Percoll (MARTINS et al., 2007b). Ainda, em espermatozoides liofilizados, foi verificado que 7% desses apresentaram lesões no DNA (MARTINS et al., 2007a), porém esse resultado ainda é considerado baixo. Essa resistência dos espermatozoides bovinos submetidos a diferentes tipos de manipulação é resultado da grande condensação do DNA nuclear, o que favorece a sua proteção.

O gradiente de densidade de Percoll foi mais eficiente que o gradiente de OptiPrep para selecionar espermatozoides X provenientes de sêmen bovino descongelado. Os procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade Percoll e OptiPrep não proporcionaram danos ao DNA dos espermatozoides bovinos descongelados.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo suporte financeiro, processos 04/06044-0 e 05/59357-9.



## REFERÊNCIAS

BALLACHEY, B.E.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v.9, n.2, p.109-115, 1988. [ [Links](#) ].

BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUÉRIN, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, n.5, p.1023-1028, 2003. [ [Links](#) ].

BONDIOLI, K.R.; ELLIS, S.B.; PRYOR, J.H.; WILLIAMS, M.W; HARPOLD, M.M. The use of male-specific chromosomal DN-A fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.31, n.1, p.95-104, 1989. [ [Links](#) ].

DE AMBROGI, M.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n.8, p.1994-2000, 2006. [ [Links](#) ].

DENSITY GRADIENT MEDIA. Applications and products. 5ed. Norway: Axis-Shield, 2005. p.15-18. [ [Links](#) ].

ELLIS, S.B.; BONDIOLI, K.R.; WILLIAMS, M.E.; PRYOR, J.H.; HARPOLD, M.M. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.242, 1988. [ [Links](#) ].

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.; 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**, v.27, n.2, p.176-188, 2006. [ [Links](#) ].

GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.943-957, 2006. [ [Links](#) ].

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B.; MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.280, 2000. [ [Links](#) ].

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.219-228, 2007. Supl. [ [Links](#) ].

KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.4, p.463-469, 2004. [ [Links](#) ].

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**, v.80, n.4, p.895-902, 2003. [ [Links](#) ].

MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biology of Reproduction**, v.71, n.1, p.28-37, 2004. [ [Links](#) ].

MARTINS, C.F.; BÁO, S.N.; DODE, M.N.; CORREA, G.A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, v.67, n.8, p.1307-1315, 2007a. [ [Links](#) ].

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, 2007b. [ [Links](#) ].

RESENDE, M.V., BEZERRA, M.B., PERECIN, F., ALMEIDA, A.O., LÚCIO, A.C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and OptiPrep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.581-587, 2009. [ [Links](#) ].

SEIDEL JÚNIOR, G.E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.3-4, p.145-156, 2003. [ [Links](#) ].

SEIDEL JÚNIOR, G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.443-446, 2007. [ [Links](#) ].

SCHWERIN, M.; BLOTTNER, S.; THOMSEN, P.D.; ROSCHLAU, D.; BROCKMANN, G. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. **Molecular Reproduction and Development**, v.30, n.1, p.39-43, 1991. [ [Links](#) ].

WATERHOUSE, K.E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D.P.; De ANGELIS, P.M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reproduction Fertility and Development**, v.18, n.7, p.781-788, 2006. [ [Links](#) ].

Data de recebimento: 28/09/2009

Data de aprovação: 10/03/2010