

EFEITO DO PROCESSO DE SEXAGEM DE SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A MORFOMETRIA DA CABEÇA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

OLIVEIRA, Katiana Mello; SAMPAIO, Guilherme Sicca Lopes; PINTO, Daniel Alves; DINIZ, Elmo Gomes; BELETTI, Marcelo Emílio.

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. Este estudo objetivou analisar alterações morfológicas da cabeça de espermatozoides causadas pelo processo de sexagem por citômetro de fluxo. Para tal utilizou-se sêmen de 15 touros mantidos em central de tecnologia de sêmen dos quais foram obtidos esfregaços de sêmen antes e após sexagem. O primeiro foi confeccionado logo após a aprovação do ejaculado para o processo de sexagem, e o segundo logo após o descongelamento do mesmo ejaculado já sexado. Os esfregaços foram fixados em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto, seguido de um banho de etanol 70% por 3 minutos. Depois foram hidrolisados em ácido clorídrico 4N por 25 minutos, lavados e secos à temperatura ambiente. Em seguida, foram corados com uma gota de azul de toluidina a 0,025% pH 4 e cobertos com lamínula. Foram obtidas 100 imagens digitais de cada lâmina a partir de microscopia de luz em objetiva de 100x, das quais foram segmentadas 100 cabeças de cada lâmina. Através dos programas desenvolvidos em ambiente Scilab determinou-se a largura (L), comprimento (C), razão largura/comprimento (L/C), área (A), elipsidade (E), perímetro (P), fator de forma (FF), simetria lateral (SL) e simetria antero-posterior (SAP) de todas as cabeças segmentadas. Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma. Os dados foram analisados pelo Teste t de Student ($p= 0,05$). A largura, comprimento, razão largura/comprimento, área, elipsidade, perímetro, simetria antero - posterior e descritores Fourier F0 e F2 não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre sêmen *in natura* e sêmen sexado, enquanto simetria lateral foi estatisticamente maior para sexado e fator de forma e descritor Fourier F1 foram maiores para sêmen *in natura*. Os resultados sugerem que o sêmen sexado não apresenta alterações significativas na forma da cabeça após o processo de sexagem por citometria de fluxo. Existe a possibilidade de que mesmo que alguns espermatozoides sofram alterações morfológicas provocados pela manipulação, estes não apresentarão condições para serem sexados por não se alinharem adequadamente na passagem do citômetro, sendo assim descartados pelo mesmo. Mesmo espermatozoides assimétricos que já existissem no ejaculado antes da sexagem seriam também descartados. Isso justificaria a maior simetria lateral encontrada no sêmen após o processamento.

EFEITO DO PROCESSO DE SEXAGEM DE SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A ESTABILIDADE DE CROMATINA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

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; VIDAL et al, 1993; BLOTTNER et al, 1994; ALI et al, 1990). 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 diferença fenotípica mensurável e validada.

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, 1984).

Diversos sistemas que utilizam à análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados na avaliação da motilidade (CENTOLA, 1996) e 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.