

CARACTERÍSTICAS DA CÉLULA ESPERMÁTICA BOVINA APÓS SELEÇÃO EM GRADIENTE DE PERCOLL EM DIFERENTES VOLUMES, TEMPO E FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO

Carvalho, J.O.^{1,2}; Machado, G.M.^{1,2}; Sartori, R.¹; Franco, M.M.¹; Dode, M.A.N.¹; Rumpf, R.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70770-900, Brasília-DF, Brasil. ²FAV-UnB, 70910-970, Brasília-DF, Brasil. margot@cenargen.embrapa.br

Para a produção *in vitro* de embriões técnicas de preparação de sêmen são usualmente utilizadas para remover espermatozoides indesejáveis, agentes crioprotetores, plasma seminal e outros fatores, visando aumentar a qualidade e seleção espermática após descongelamento. Dentre estas técnicas a centrifugação em gradiente de Percoll tem sido a mais utilizada, existindo uma variação entre laboratórios quanto aos procedimentos adotados na utilização desse método. O presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade do espermatozoide bovino antes e após a passagem pelo gradiente de Percoll, utilizando diferentes velocidades, tempo de centrifugação e volume de Percoll. Foram utilizadas amostras de sêmen do mesmo touro e partida e realizadas cinco réplicas. Em cada réplica foram descongeladas cinco palhetas de 0,5 mL formando um pool. Desse pool foram retiradas amostras para avaliação (pré- Percoll) da motilidade, morfologia espermática (contraste de fase), integridade de acrossoma (coloração com *peanut agglutinin [PNA] - fluorescein isothiocyanate [FICT]*), integridade de membrana (coloração com iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína – FDA) e integridade de DNA (coloração com *acridine orange*). O restante do sêmen foi dividido em três frações com volumes iguais e distribuídas em três tratamentos: T1 - 2 mL de Percoll 45% e 2 mL de Percoll 90%, centrifugados por 20 minutos a 700 G; T2- 400 µL de Percoll 45% e 400 µL de Percoll 90% centrifugados por 20 minutos a 700 G e T3- 400 µL de Percoll 45% e 400 µL de Percoll 90% centrifugados por 5 minutos a 5200 G. Após a passagem pelo Percoll, foi feita lavagem em 1,0 mL de meio de capacitação por 5 minutos à 700 G no T1 e T2 e a 5200 G no T3. Após a lavagem foram retiradas amostras para as mesmas avaliações realizadas pré- Percoll. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA (P<0,05). A porcentagem de espermatozoides móveis na avaliação pré- Percoll foi de 31,0% (± 6,5) aumentando (P<0,05) após a passagem pelo gradiente em todos os tratamentos (T1 = 86,0% ± 8,9; T2 = 83,0% ± 8,3; T3 = 81,25% ± 8,5). Entretanto, não houve efeito do tratamento (P>0,05) na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, na integridade da membrana, na integridade do acrossoma e na integridade da cromatina. Observou-se uma tendência no aumento de espermatozoides com membrana íntegra nos tratamentos T1 (45,3% ± 13,4), T2 (41,8% ± 26,9) e T3 (54,0% ± 11,7) em relação a avaliação pré- Percoll (38,5% ± 4,8). Os dados mostraram que a passagem pelo Percoll aumenta a porcentagem de espermatozoides móveis e não afeta as demais características espermáticas avaliadas, independente do volume de Percoll, do tempo e da força de centrifugação utilizada. Esses resultados sugerem ser possível utilizar um volume menor de Percoll por um período de tempo mais curto, diminuindo assim o custo e o tempo de manipulação da FIV. Entretanto, para que esse procedimento seja utilizado rotineiramente, mais avaliações são necessárias utilizando maior número de touros e analisando o efeito desses tratamentos na proporção macho:fêmea dos embriões produzidos. Apoio financeiro: Apoio da Embrapa-Macroprograma II.

BOVINE SPERM CELL CHARACTERISTICS AFTER SELECTION BY PERCOLL GRADIENT USING DIFFERENT VOLUMES, TIME AND FORCE OF CENTRIFUGATION

Sperm selection methods are routinely applied on *in vitro* embryo production systems to remove dead spermatozoa, seminal plasma and cryoprotectors aiming to increase sperm quality. Although several methods for sperm selection are available, Percoll density gradient has been the most widely used. However, there is a great variability among laboratories regarding the procedures utilized to perform such method. The present study had the objective to evaluate bovine sperm quality after passage through Percoll gradient using different volumes, time and force of centrifugation. Frozen semen from one ejaculated of a single bull was used for all treatments in each of the 5 replicates. In each replicate 5 semen straws were thawed and pooled together. Samples were removed from the pool to pre-Percoll evaluation of motility, sperm morphology (phase contrast microscopy, acrosome integrity (peanut agglutinin [PNA] - fluorescein isothiocyanate [FICT] stain), membrane integrity (propidium iodide and diacetate of carboxyfluorescein – FDA stain) and DNA integrity (acridine orange stain). The remained semen pool was divided into 3 fraction of equal volume, which were distributed in 3 treatments: T1 - 2 mL of Percoll 45% and 2 mL de Percoll 90%, centrifuged for 20minutes at 700 G; T2- 400 µL of Percoll 45% and 400 µL of Percoll 90% centrifuged for 20 minutes at 700 G and T3- 400 µL of Percoll 45% and 400 µL of Percoll 90% centrifuged for 5 minutes at 5200 G. After *Percoll* centrifugation, the pellets were washed in 1 ml of capacitation media for 5 minutes at 700 G in T1 and T2 and at 5200 G in T3. After the wash semen samples were removed to evaluate the same parameters performed in the pre- Percoll evaluation. Data were analyzed by ANOVA (P<0.05). The percentage of sperm motility in the pre- Percoll evaluation was 31.0% (± 6.5), which increased (P<0.05) after passage through the Percoll gradient in all treatments (T1 = 86.0% ± 8.9; T2 = 83.0% ± 8.3; T3 = 81.25% ± 8.5). However, no effect of treatments (P>0.05) was observed in the percentage of spermatozoa morphologically normal, in the membrane integrity, in the acrosome integrity and in the chromatin integrity. There was a tendency for a higher percentage of sperm cells with intact plasma membrane in treatments T1 (45.3% ± 13.4), T2 (41.8% ± 26.9) and T3 (54.0% ± 11.7) compared to the pre- Percoll evaluation (38.5% ± 4.8). The data showed that selection by Percoll gradient increases sperm motility with no effect in the other sperm characteristics evaluated, independent of the Percoll volume, the time and the force of centrifugation utilized. These results suggest that it is possible to use lower volumes of Percoll for a shorter centrifugation time, which would lead to a reduction in cost and time of manipulation for IVF. However, before include those changes in the routine, more studies are needed using a higher number of bulls semen and evaluating the effect of those treatment in embryo production and sex ratio of the embryos. Financial Support: Embrapa-Macroprograma II.