

TÉCNICAS DE SEXAGEM ESPERMÁTICA E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL

(Sperm sexing techniques and their importance in animal production)

Leonardo Alves Rodrigues CABRAL^{1*}; Wallison Bruno PACHECO²; Suane Silva Alves dos SANTOS³; Adriano da Silva PRADO³; José Ferreira NUNES⁴

¹Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Faculdade de Veterinária (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi. CEP: 60.714-903; ²PPGCV (UECE); ³Faculdade de Veterinária (UECE); ⁴PPGBIOTEC (UECE). *E-mail: leonardocabral@outlook.com

RESUMO

O sêmen sexado tem grande potencial para a produção animal, permitindo a seleção do sexo de produtos desejados, de acordo com o sistema de produção (leite ou carne), reduzindo custos e apresentando um melhor aproveitamento da criação animal. No entanto, esse método ainda é pouco utilizado em protocolos *in vivo*, como inseminação artificial (I.A) intrauterina e transcervical, pois os métodos mais empregados para esse fim ainda causam diversas alterações deletérias na qualidade seminal. Baseado nisto, novas metodologias de sexagem têm sido pesquisadas, para tornar essa biotécnica mais prática e barata. O estudo de novas técnicas de sexagem visa promover melhor qualidade nos parâmetros seminais, após sexagem, com menor custo, melhor aproveitamento do ejaculado e boas taxas de concepção para a inseminação *in vivo*. Desta forma, o objetivo desta revisão foi abordar os avanços na sexagem espermática e sua importância para a produção animal.

Palavras-chave: Sêmen, imunossexagem, nanopartículas, citometria.

ABSTRACT

*Sexed semen has great potential for animal production, allowing the selection of sex of desired products according to the production system (milk or meat), reducing costs, and showing better use of matrices. However, this method is still little used in *in vivo* protocols, such as intrauterine and transcervical artificial insemination (AI), as the most used methods for this purpose still cause several deleterious changes in seminal quality. Based on this, new sexing methodologies have been researched to make this biotechnology more practical and inexpensive. The study of new sexing techniques aims to promote better quality in seminal parameters after sexing with lower costs, better ejaculate utilization, and good conception rates for *in vivo* insemination. Thus, this review aimed to address advances in sperm sexing and its importance for animal production.*

Keywords: Sperm, immunosexing, nanoparticles, cytometry.

INTRODUÇÃO

Segundo a ONU (2012), a população mundial, em 2050, será superior a 9,5 bilhões de pessoas, portanto, o aumento na produtividade é essencial para as futuras demandas. O Brasil possui uma área legal pequena para a expansão agropecuária, porém, incrementos na tecnologia que aumentem a produtividade poderão ajudar a suprir as futuras demandas (SAATH e FACHINELLO, 2018). Nesse cenário, o uso de tecnologias que propiciem o aumento da produção de alimentos é de extrema importância, a sexagem espermática permite a maximização da produção animal, com menor custo. Além disso, essa tecnologia pode ser somada com o uso da IA, conferindo-lhe papel relevante na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho (HOSSEPIAN DE, 2007).

A sexagem espermática vem sendo estudada, com o intuito de separar os gametas, baseando-se nos cromossomos sexuais (“X” e “Y”), tendo como parâmetro as diferenças estruturais entre esses gametas. Na produção animal, principalmente na criação de bovinos, o sêmen sexado vem sendo mais aplicado na área comercial, devido ao potencial de obtenção de incrementos na produtividade de carne e leite. Além disso, essa biotécnica permite uma aceleração nos programas de melhoramento genético. A sexagem espermática demonstra grande potencial, no entanto, a aplicação dessa, a campo, associada à inseminação artificial em tempo fixo, ainda é discutida quanto a vantagens e custo-benefício (SHARPE e EVANS, 2009; BRITO *et al.*, 2018).

A utilização da sexagem espermática é de grande valor para a indústria leiteira, pois permite a seleção do nascimento de fêmeas, o que possibilita aumento na produção de leite, sem a necessidade de aumentar o plantel e propicia melhoramento genético em menor intervalo de tempo. Na indústria de animais para corte, onde o macho é mais desejado, devido ao melhor rendimento de carcaça, essa biotecnologia também pode ser usada, melhorando a produção de carne (SEIDEL, 2007).

A sexagem espermática é uma das técnicas mais esperadas pela indústria de inseminação artificial (IA). De fato, na produção animal, como de ruminantes, suínos e aves, essa técnica pode promover aumento na produção de alimentos, nos rendimentos e no melhor aproveitamento de animais de alto valor zootécnico. As primeiras pesquisas de presseleção foram realizadas, com base na separação de espermatozoides de coelhos e de suínos por centrifugação (BATISTA *et al.*, 2008). Ao final da década de 1960, com o uso do citômetro de fluxo, houve um aumento no interesse em mensurar o DNA das células, principalmente para o diagnóstico de câncer. Na reprodução, essa técnica foi utilizada para avaliar alterações espermáticas, associadas a danos genéticos (JOHNSON e WELCH, 1999).

Diante do exposto, esta revisão teve por objetivo abordar as novas técnicas usadas na sexagem espermática e seu potencial para a produção animal.

DESENVOLVIMENTO

Sexagem espermática

A sexagem espermática é de grande importância para a produção leiteira, em âmbito comercial, pois a seleção do sexo permite redução no nascimento de machos, o que reduz gastos e intensifica o investimento em fêmeas, com obtenção de maior produção e utilização de menos animais. Essa vantagem também é observada na produção de carne, sendo possível promover o maior nascimento de machos, possibilitando maior rendimento de carcaça. Além disso, em ambos os casos, há menos desgastes das fêmeas matrizes, que poderão gerar mais produtos rentáveis, com menor número de partos (BRITO *et al.*, 2018). Nesse contexto, essa biotécnica é promissora para as futuras demandas do mercado, no mundo, segundo Fernandes e Miotto (2019), até o final do século XXI, a produção mundial de carne bovina terá aumento de 37%, a ovina/caprina deverá aumentar em 55% e a de leite, em pequenos ruminantes e bovinos, em 63%.

A sexagem espermática vem sendo pesquisada, permitindo a criação de novas técnicas de separação de espermatozoides “X” e “Y”; no entanto, essas técnicas ainda estão em processo

de adequação e validação, por ainda causarem danos irreparáveis aos espermatozoides e ao seu DNA (SCOTT, 2018). A citometria de fluxo ainda é a técnica que permite a comercialização das doses sexadas, devido aos 90% de acuidade já comprovada (SHARPE e EVANS, 2009). No entanto, tem-se obtido avanços nas novas técnicas de sexagem, como utilização de anticorpos específicos (MATTA, 2003), uso de nanopartículas magnéticas (DOMINGUEZ *et al.*, 2018), e a técnica de SexedUltraTM (GONZÁLEZ-MARÍN *et al.*, 2018) dentre outras; que, têm por objetivo serem alternativas mais práticas e com menos efeitos deletérios ao sêmen.

Sendo assim, as metodologias de sexagem, para serem consideradas eficientes, precisam atender aos seguintes requisitos: a ação sobre as funções espermáticas ser a menor possível; serem eficientes; todas, ou a maioria das células devem ser sexadas, com o mínimo descarte e perda de espermatozoides, durante o processo; ter acuidade de 100%; ser reproduzível; ser rápida e prática e ter custo acessível o suficiente para se difundir no mercado (BATISTA *et al.*, 2008). Vale ressaltar, que a biotécnica da criopreservação seminal, utilizada juntamente com a sexagem espermática, pode ter um papel relevante (FERRÉ *et al.*, 2018).

Diferenças entre espermatozoides “x” e “y”

Algumas técnicas de sexagem são baseadas nas diferenças físicas entre os espermatozoides “X” e “Y”, como diferenças na carga elétrica, no tamanho e morfologia de cabeça, no conteúdo de DNA e na massa (VILLADIEGO *et al.*, 2018). As cargas elétricas entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y são diferentes, possuem carga de -20 mV e -16mV, respectivamente. Essa diferença permite explorar técnicas que possam separar os espermatozoides (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2018). Uma dessas técnicas consiste no uso de nanopartículas magnéticas, que, através de adição de metal ao meio e com uso de imã, é capaz de separar esses espermatozoides (CASTEX e LOSINNO, 2018).

A citometria de fluxo se baseia na diferença entre a quantidade de DNA nos espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. O espermatozoide que contém cromossomo X possui maior quantidade de DNA, em média 4% a mais, dessa forma, os corantes usados coram mais fortemente os espermatozoides com maior quantidade de DNA, permitindo, assim, que o citômetro separe a população espermática (SEIDEL, 2007). Na célula espermática, diferente da maioria dos outros tipos celulares, há uma compactação excessiva da cromatina na cabeça do espermatozoide, que é morfologicamente plana, a qual provoca alto índice de refração, ocasionando uma diferença entre a cabeça do espermatozoide e o meio circundante, o que resulta na emissão preferencial de luz, no plano da célula. Devido a essa propriedade, a orientação da cabeça do espermatozoide, em relação ao feixe de laser de excitação e aos detectores ópticos é crítica para a resolução (JOHNSON *et al.*, 1994).

A técnica de SexedUltraTM consiste em uma adaptação de uma técnica de coloração (SEIDEL e GARNER, 2002). As técnicas de coloração se baseiam, principalmente, no tamanho e morfologia da cabeça, ou nas diferenças de massas existente entre os espermatozoides de cromossomos diferentes. A imunosexagem, diferente das demais citadas, não se baseia em uma diferença física entre os espermatozoides, mas, sim, na diferença de proteínas específicas expressas na membrana, que permitem o uso de anticorpo específico para o espermatozoide que se deseja eliminar, com produção de anti-proteína “X” ou anti-proteína “Y” (MATTA, 2003).

Citometria de fluxo (CF)

Desde os primeiros nascimentos de animais com sêmen sexado, através do citômetro de fluxo (JOHNSON *et al.*, 1989), que foi realizado em coelhas, cirurgicamente inseminadas no oviduto, estudos com sexagem espermática, em diversas espécies, vêm sendo realizados, para avaliar as diferenças no conteúdo de DNA dos espermatozoides entre as diferentes espécies e para tentar aprimorar essa separação. O espermatozoide “X” contém maior quantidade de DNA que o espermatozoide “Y”; portanto, a medição na quantidade de DNA de cada espermatozoide pode diferenciá-los em “X” e “Y” (SEIDEL, 2007). A técnica desenvolvida pelo laboratório de Livermore, que consiste na sexagem por quantificação de DNA, usando a CF, foi a mais utilizada (FOOTE, 2002). Mensurações no conteúdo de DNA foram realizadas e foram constatadas variações entre os espermatozoides “X” e “Y”, com diferença de 3,6% no suíno; 3,7% no garanhão; 3,8% no bovino; 3,9% no cão e 4,2% no ovino (BATISTA *et al.*, 2008).

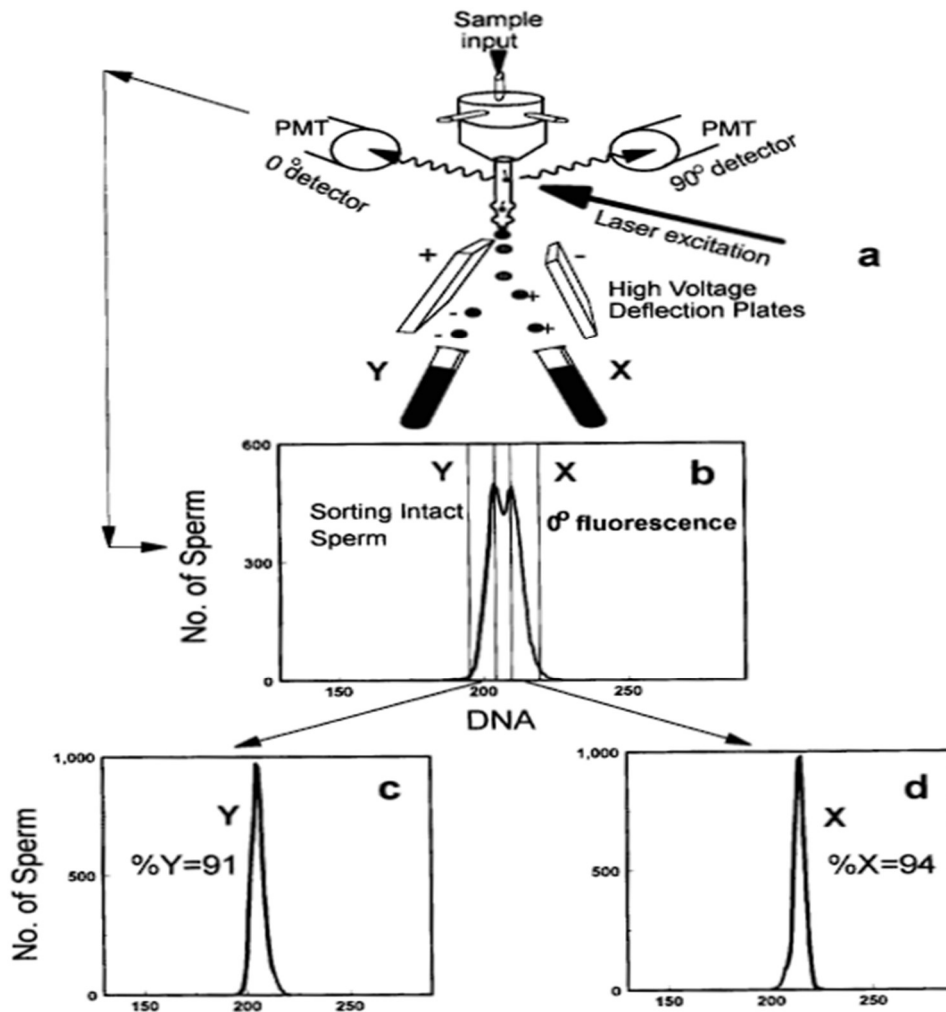
O método de CF consiste na mensuração da quantidade individual de DNA de cada célula espermática pela fluorescência emitida pelo corante Hoechst 33342, que se liga ao DNA. Devido à diferença na quantidade de DNA, os espermatozoides “X”, após serem expostos ao corante, apresentam brilho mais intenso que os espermatozoides “Y”. Em seguida, os espermatozoides passam em uma fila única, que contém um campo elétrico, que separa e os direciona para um tubo de coleta, a partir das diferenças de carga elétricas, positivas ou negativas (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

Em bovinos, tem-se utilizado protocolos, em que o ejaculado é diluído para uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, em meio Tris, suplementado com o corante fluorescente Hoechst 33342, de 49 a 65mM, incubado durante 45 minutos, a 35 °C. Após a coloração, as amostras são diluídas, na proporção de 1:1, em meio Tris, suplementado com 4% de gema de ovo e 0,0015% de corante alimentar e filtrado, através de um filtro de 50µm, para remover detritos ou células aglutinadas antes da triagem. As amostras são submetidas a um citômetro (MoFlo SX, Beckman Coulter, USA), projetado para a sexagem espermática de alta velocidade (20.000 células/s), operado a 40psi, com laser pulsado de diodo sólido, a 125mW, com fluido da bacia bovina. As comportas são ajustadas, para atingir 90% de pureza e os espermatozoides sexados são classificados em meio Tris. Depois de serem refrigerados a 4 °C por 90 min., os espermatozoides sexados são centrifugados e diluídos em Bioxcell, para alcançar a concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL (IMV, L'Aigle, France). Por fim, o sêmen é envasado em palhetas de 0,25mL e congelados (CARVALHO *et al.*, 2018).

Em estudo de BLONDIN *et al.* (2009), foi relatado que de 82 embriões produzidos no laboratório, com sêmen sexado por CF de diferentes touros, 92% eram do sexo feminino, conforme determinado com técnicas de PCR padrão, indicando a alta proporção de espermatozoides “X” em sêmen sexado. A técnica utilizada se baseia em um trabalho de Johnson *et al.* (1999), onde o citômetro de fluxo separa os espermatozoides com um laser de excitação e placas de deflexão de alta tensão (Fig. 01), através do conteúdo do DNA XN, após um tratamento com fluorocromo (Hoechst 33342), que se liga ao DNA, possibilitando que o detector de fluorescência diferencie o cromossomo Y (mais escuro), do cromossomo X (mais brilhante).

O uso de CF *in vivo* é limitado, devido aos altos custos e taxas de fertilidade reduzidas (CARVALHO *et al.*, 2018). Essa diferença de fertilidade entre seu uso *in vitro* e *in vivo*

demonstra que o processo de sexagem por citometria de fluxo afeta a capacidade do espermatozoide de conseguir alcançar e de se ligar ao ovócito.



(Fonte: JOHNSON *et al.*, 1999)

Figura01: Separação de espermatozoides pelo citômetro de fluxo com laser e placas de deflexão.

Os espermatozoides são analisados por citometria de fluxo (a), quanto ao seu conteúdo de DNA, coletando informações de fluorescência, que são proporcionais ao conteúdo de DNA da face achatada da cabeça do espermatozoide. Esta informação é coletada no detector de fluorescência de 0" (uma modificação). O detector de fluorescência de 90" é usado, para determinar como o esperma é orientado. As janelas de classificação (b) em torno do esperma com cromossomo Y, mais escuro e do esperma com cromossomo X, mais brilhante são usadas, para determinar quais espermatozoides são coletados. A validação do esperma classificado é feita, reanalisando alguns dos espermatozoides de ambas as frações coletadas, Y (c) e X (d).

A CF apresenta custo elevado e tem utilização limitada, pois leva, aproximadamente, 30 minutos para sexar uma dose de sêmen, sendo pouco prática na utilização comercial. Além disso, o sêmen passa por diferentes processamentos, aumentando as chances de haver danos e estresse à célula espermática. Carvalho *et al.* (2018) avaliaram sêmen criopreservado bovino sexado, quanto ao tempo de sobrevivência da célula espermática e a capacidade de se ligar a

células do oviduto. O sêmen não sexado obteve resultados superiores, em parâmetros como motilidade e estabilidade de membranas e o processo de sexagem afetou a capacidade do espermatozoide em se ligar e permanecer ligado a células ovidutais. Em estudo de Carvalho *et al.* (2013), foi identificado que a sexagem por CF altera a forma da cabeça do espermatozoide e algumas características de superfície, como rugosidade da membrana plasmática.

Resultados satisfatórios na CF dependem de uma boa qualidade do sêmen, com viabilidade superior a 90% no sêmen a fresco, boa concentração espermática, de acordo com a espécie (1 x10⁶/mL em bovinos), correlacionada com motilidade espermática satisfatória no ejaculado (OSES *et al.*, 2009). As células espermáticas são expostas a processos físicos e químicos, como diluição, incubação, coloração, passagem pelo CF, exposição ao laser, centrifugação e pressão. Esses processos causam danos, induzem capacitação e provocam quedas na qualidade espermática, sendo ainda mais prejudicial, se o sêmen for usado para a criopreservação (SEIDEL e GARNER, 2002).

A busca por outras tecnologias visa a substituição da CF por tecnologias que sejam mais econômicas e que exijam menos processamento do sêmen, o que reduz danos aos espermatozoides e que possa ser usada com efetividade na inseminação artificial (SHARPE e EVANS, 2009).

Imunossexagem

A imunossexagem, desenvolvida por MATTA (2001), é uma metodologia que faz o uso de anticorpo monoclonal contra proteína sexo-específica, associada à via clássica do complemento, que é capaz de utilizar anticorpos para espermatozoides de cromossomo indesejável. É um método mais simples, mais barato e com menos efeitos negativos sobre o sêmen; além disso, não há limite no número de espermatozoides para a sexagem.

O antígeno H-Y foi mencionado pela primeira vez em 1955. por Eichwald e Silmsler, através de estudos com transplantes de pele em camundongos, onde havia rejeição do transplante por parte das fêmeas. A constatação foi observada em alto grau em outras espécies de mamíferos isogênicos, como ratos (BILLINGHAN e SILVERS, 1960) e coelhos (CHAI, 1968). A presença do antígeno pode ser verificada, por meio do teste de citotoxicidade e pela detecção de anticorpos macho-específicos. Os principais problemas dessa abordagem são as transcrições limitadas que ocorrem em célula haploide e pontes citoplasmáticas, que se formam entre os espermatozoides, até momentos antes da liberação do epitélio seminífero (PARKINSON e MORREL, 2019).

O papel da proteína H-Y consiste na diferenciação sexual embrionária, pois sem a presença do cromossomo “Y”, a gônada embrionária se desenvolverá em ovário (WACHTEL *et al.*, 1975). Os peptídeos H-Y são apresentados como um grande complexo de histocompatibilidade de moléculas sobre a superfície da célula, viabilizando a sexagem dos espermatozoides em larga escala, através da imunologia, pelas proteínas de superfície por anticorpos específicos, anti-espermatozoide “X” e anti-espermatozoide “Y” (HENDRIKSEN, 1999). Em estudo de SOUZA *et al.* (1999), avaliou-se o uso de anticorpo monoclonal contra uma proteína macho-específica de peso determinado (19 kDa), expressada na superfície de espermatozoides de cromossomo “Y”, em sêmen fresco, não lavado de bovinos. Nesse experimento, foi observado que a adição de anticorpo e complemento obtido de soro de cobaia gerou menor perda da qualidade seminal e não apresentou formação de grumos.

Bradley *et al.* (1987) identificaram uma proteína com peso molecular de 25kDa, sendo descrita como a proteína macho-específica presente em espermatozoides de ovinos. Tilburg *et al.* (2006) identificaram antígeno macho-específico de ovinos, ao estudarem proteínas de peso de 25 kDa, com diferentes hidrofobicidades.

Em experimento de Matta (2003), foi realizado o método de sexagem com anticorpo monoclonal. Esse método abrange três etapas: coleta do sêmen; adição de anticorpo monoclonal anti-proteína macho-específica e adição de complemento. Sendo esperado, após isso, 50% de motilidade no sêmen, correspondendo à morte dos espermatozoides de cromossomo indesejado. Para tanto, a fonte de complemento utilizada foi testada, quanto à espécie animal e aquecida, visando desativar a via alternativa do complemento, sem comprometer a via clássica, pela inativação da proteína B. A inativação da via alternativa tem por objetivo manter a seleção de apenas um tipo de célula espermática. Os anticorpos macho-específicos foram utilizados, para reconhecer espermatozoides portadores do cromossoma Y. Nesse experimento, obteve-se taxa de 80% de embriões fêmeas, utilizando 20µL de líquido ascético e 20µL de soro de cobaia, aquecido a 52,2 °C, sendo observado que, nessas condições, a motilidade espermática não foi alterada e houve menor consumo de reagentes.

Portanto, baseado nesses dados, observa-se que o método de imunossexagem tem mostrado ser mais simples, com melhor custo-benefício e sem efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário, tendo, ainda, como vantagem, o uso de todo o ejaculado, não havendo limite para o número de espermatozoides sexados.

Em relação aos custos, foi demonstrado que as doses confeccionadas com sêmen imunossexado tem custo muito menor, em relação as doses sexadas com CF. Além disso, o tipo de mão de obra e a técnica mais simplificada, sem necessitar equipamentos pesados e de alto custo, justificam seu melhor aproveitamento a campo por profissionais que não precisam ser, necessariamente, especializados (MAIA *et al.*, 2020).

Portanto, a imunossexagem pode ser uma alternativa para sexagem espermática, tendo como vantagem, em relação à CF, o uso de todo o ejaculado, apresenta menor custo e mais prática de se fazer a campo com a capacidade de ser mais efetiva nas rotinas de IA. No entanto, essa tecnologia ainda não é utilizada em larga escala, por ter confecção ainda limitada, principalmente, no que diz respeito às outras espécies domésticas e ainda é indisponível no mercado, principalmente, por se tratar de uma tecnologia ainda sob patente.

SexedUltra™ (SU)

O método SexedUltra™ consiste na separação dos espermatozoides quanto à presença do cromossomo “X” ou “Y”, utilizando o método básico de diluição e coloração de sêmen, como descrito em Seidel e Garner (2002), com modificações. Esse método é uma revisão das condições sob as quais o sêmen é processado e classificado, incluindo o uso dos sistemas de classificação espermática Digital Genesis™, projetados em colaboração com a Cytonome ST LLC. As formulações de mídia no método SexedUltra™ são secretas e de propriedade intelectual da Inguran LLC, através da patente US 9,781,919. SexedUltra™ foi avaliado em, aproximadamente, 90% de pureza do cromossomo “X” (GONZÁLEZ-MARÍN *et al.*, 2018).

Lenz *et al.* (2016) avaliaram a diferença entre método XY e SexedUltra (SU), com inseminação de 6.930 novilhas da raça Holandesa e foi constatada uma maior taxa de concepção, usando o método SU ($p < 0,001$), em comparação com o método XY (45,7±1,7 vs.

41,2±1,6%). Em um outro experimento, nesse mesmo estudo, os autores utilizaram diferentes concentrações de espermatozoides por palheta de inseminação, o que apresentou melhor resultado com o tratamento SU, com 4×10^6 spz/palheta.

González-Marín *et al.* (2018) realizaram experimento *in vitro*, utilizando sêmen bovino fresco e descongelado com SU e tratamento convencional, avaliando tempo de incubação. Foi observado que o sêmen sexado por SU descongelado obteve melhores taxas de acrossoma íntegro, após incubação de 3 horas, a 37 °C, enquanto no sêmen refrigerado. A fragmentação de DNA foi menor, no SU, em comparação com o convencional, durante todo o período de incubação, a 37 °C.

Thomaz *et al.* (2017) realizaram IATF, com sêmen sexado por SU e sêmen convencional. Ao final de 60 dias, após IA, as taxas de concepção não diferiram entre os diferentes tratamentos, com taxas de 89% para sêmen sexado e convencional. O sexo fetal foi identificado em 389 novilhas, no total. O método teve uma ótima acurácia, com o nascimento de 96% de fêmeas, enquanto, com o tratamento convencional, houve nascimento de 49% de fêmeas.

A técnica de SexedUltra™, apesar de ainda ter sua metodologia sob segredo de patente, demonstra avanços na sexagem, em relação a técnicas de citometria de fluxo convencional. A citometria, apesar de mais utilizada, pode provocar lesões no DNA e causar perdas significativa na qualidade seminal.

Nanopartículas magnéticas

A técnica de separação magnética de células (*Magnetic Activated Cell sorting-MACS*) é uma metodologia recente, usada em protocolos de reprodução assistida. Esta tecnologia tem mostrado que é possível separar espermatozoides móveis, viáveis e morfologicamente normais, que exibem uma tolerância significativa na criopreservação e tem melhor potencial de fertilização. MACS é, tecnicamente, um processo convenientemente fácil de aplicar em laboratório (CASTEX e LOSINHO, 2018).

Nanopartículas magnéticas (NPM) são adicionadas ao meio diluente e se ligam ao espermatozoide “Y”, que é, então, atraído por ímãs, enquanto o espermatozoide “X” permanece no meio. As nanopartículas possuem um diâmetro de 50 nanômetros e são compostas por um núcleo de ferro magnético, coberto por sílica e carregados negativamente. Dessa forma, os espermatozoides “Y” se ligam a essas nanopartículas, a amostra de sêmen fica exposta aos ímãs durante 20 minutos; assim, o complexo espermatozoide “Y”-NPM fica fixado à parede do tubo, devido à força magnética, enquanto os espermatozoides portadores de cromossomo X permanecem suspensos no meio (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2018).

O potencial *Zeta* é o potencial elétrico que se produz no plano de deslocamento do espermatozoide, entre sua membrana plasmática e o ambiente circulante, que possui carga negativa. No espermatozoide “X”, essa carga é de -20mV, enquanto, no “Y”, essa carga é de -16mV (CASTEX e LOSINHO, 2018). Devido a esse fato, as NPM têm maior afinidade pelo espermatozoide Y, se unindo a eles.

Castex e Losinho (2018), ao realizarem IA em equinos com sêmen sexado, utilizando a técnica de nanopartícula magnética, inseminaram 26 éguas com células espermáticas de cromossomo X, dos 26 animais nascidos 25 eram fêmeas. A viabilidade espermática não foi

afetada pelo método. As taxas de motilidade não diferiram entre grupo sexado e grupo controle, mesmo pós-congelação.

Em experimento *in vitro*, Domínguez *et al.* (2018) avaliaram a técnica de nanopartículas em sêmen de jumentos, onde 90% do sêmen foi, de fato, sexado. Não houve diferença entre o sêmen sexado e o controle, quanto à viabilidade, motilidade e parâmetros de velocidade, reação de acrossoma e fragmentação de DNA.

A técnica de sexagem por nanopartículas tem, por vantagem, não necessitar de equipamentos caros ou tecnificados, o material pode ser levado a campo e é de fácil manipulação. Essa técnica, portanto, apresenta vantagens importantes, em relação à praticidade. O aprimoramento da nanotecnologia e confecção desses materiais torna essa técnica com grande potencial para reduzir custos e facilitar o uso, para profissionais da área.

Importância do uso de biotécnicas na caprinocultura

O Brasil representa o 22º maior rebanho mundial de caprinos. O rebanho nacional de caprinos, em 2017, alcançou 9,59 milhões de cabeças, sendo 8,9 milhões na região Nordeste. Portanto, pode-se observar que o rebanho brasileiro consiste no efetivo da região Nordeste somado a uma pequena participação de outros estados (MAGALHÃES *et al.*, 2018). Apesar do potencial da espécie para o desenvolvimento da agropecuária na região Nordeste, esse efetivo teve uma redução de 14%, desde 2005 (IBGE, 2017). Segundo McManuus *et al.* (2014), 70% do rebanho é formado por caprinos naturalizados e exóticos, de animais sem padrão racial definido e criados extensivamente.

O Estado do Ceará possui 1.075.850 cabeças de caprinos, o que corresponde a, aproximadamente, 18% do total nacional, sendo o 4º colocado em efetivo caprino do Brasil, superado pela Bahia, Pernambuco e Piauí (IBGE, 2017). Estados como Paraíba e Rio Grande do Norte detêm as maiores produções de leite de cabra, 18 mil e 10 mil litros de leite por dia, respectivamente. Apesar da baixa expressão em termos quantitativos, a exploração da cabra tem uma importância socioeconômica, para geração de emprego e renda no Brasil (LOBO *et al.*, 2010).

Baseado no efetivo de caprinos da região Nordeste, pode-se observar a importância e potencial da caprinocultura na região. O uso de biotécnicas reprodutivas, como criopreservação seminal, sexagem espermática e tecnologias de reprodução assistida são essenciais para o melhoramento genético. O sucesso de novas biotécnicas seminais na produção animal é importante para o incremento tecnológico na cadeia produtiva.

CONCLUSÕES

O uso de sêmen sexado é importante para o desenvolvimento da produção animal e tem a capacidade de garantir maior produção, com maximização do progresso genético, uso mais racional dos animais e aumento dos lucros no sistema de produção, além de minimizar as perdas. As novas técnicas de sexagem, como a nanossexagem, aliada à técnica de anticorpo específico para cromossomos X e Y parece ser o método de sexagem mais promissor, por ser mais simples de se realizar e causar menos danos para as células espermáticas, o que promove melhor aproveitamento do ejaculado. O desenvolvimento dessa técnica necessita que a

metodologia seja eficiente e atenda às características necessárias, para que seja viável e se difunda no mercado, para ter a capacidade de ser usado em larga escala. As técnicas de sexagem têm evoluído, sendo melhor aproveitadas com o uso da inseminação artificial em tempo fixo *in vivo*, principalmente após emprego da criopreservação. No entanto, muitas questões ainda precisam ser elucidadas e mais pesquisas são necessárias, para aprimorar, ou até desenvolver novos métodos, que possam atender ao mercado.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, A.M.; SILVA, A.R.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Sexagem de sêmen. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v.11, n.2/3, p.49-56, 2008.
- BILLINGHAN, R.E.; SILVERS, W.K. Studies of tolerance of the Y chromosome antigen in mice. **Journal of Immunology**, v.85, p.14-16, 1960.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v.71, n.1, p.30-38, 2009.
- BRADLEY, M.P.; FORRESTER, I.T.; HESLOP, B.F. Identification of a male specific (H-Y) antigen on the flagellar plasma membrane of ram epididymal spermatozoa. **Human Genetics**, v.75, p.362-367, 1987.
- BRITO, B.F.; SANTOS, B.M.B.; MAIA, L.C.P.; MATTA, M.F.R.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42, n.3/4, p.90-95, 2018.
- CARVALHO, J.O.; SARTORIA, R.; RODELLO, L.; MOURÃO, G.B.; BICUDO, S.D.; DODE, M.A.N. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, v.207, p.30-37, 2018.
- CARVALHO, J.O.; SILVA, L.P.; SARTORI, R.; DODE, M.A. Nanoscale differences in the shape and size of x and y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. **PLoS One**, v.8, n.3, p.1-7 (e59387), 2013.
- CASTEX, H.R.; LOSINNO, L. Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides x en semen equino. Resultados de campo y comerciales. **Medicina Veterinaria Y Zootecnia**, v.13, n.2, p.268-275, 2018.
- CHAI, C.K. The effect of inbreeding in rabbits. **Transplantation**, v.6, n.5, p.689-693, 1968.
- DOMÍNGUEZ, E.; MORENO-IRUSTA, A.; CASTEX, H.R.; BRAGULAT, A.F.; UGAZ, C.; CLEMENTE, H.; GIOJALAS, L.; LOSINNO, L. Sperm Sexing Mediated by Magnetic Nanoparticles in Donkeys, a Preliminary In Vitro Study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.65, p.123-127, 2018.
- EICHWALD, E.J.; SILMSER, C.R. Skin. **Transplant Bull**, v.2, p.148-149, 1955.

FERNANDES, L.; MINHOTO, M. A produção primária e a quantidade de oferta alimentar de carne, ovos e leite a nível mundial os últimos 50 anos e perspectivas para o século XXI. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v.13, n.1, p.60-70, 2019.

FERRÉ, L.; GRÖTTER, L.; FRESNO, C.; CATTANEO, L. Efecto de la suplementación con ciclodextrinas cargadas con colesterol al semen sexado bovino post descongelación para su uso en producción *in vitro* de embriones. **Archivos de Zootecnia**, v.67, n.259, p.332-339, 2018.

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, v.80, n.2, p.1-10, 2002.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GÓNGORA, C. E., GILLIGAN, T. B., EVANS, K. M., MORENO, J. F., & VISHWANATH, R. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v.114, n.1, p.40-45, 2018.

HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v.52, n.1, p.1295-1307, 1999.

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, supl.1, p.219-228, 2007.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de Dados Agregados. Tabela 3939: **Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3939#resultado>. Acesso em: 16 nov. 2018.

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; HAWK, H.W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v.41, n.2, p.199-203, 1989.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1323-1341, 1999.

LENZ, R.W.; GONZALEZ-MARIN, C.; GILLIGAN, T.B.; DEJARNETTE, J.M.; UTT, M.D.; HELSER, L.A.; HASENPUSCH, E.; EVANS, K.M.; MORENO, J.F.; VISHWANATH R. 190 SexedULTRA™, a new method of processing sexsorted bovine sperm improves conception rates. **Reproduction, Fertility & Development**, v.20, n.1, p.203-204, 2016.

LÔBO, R.N.B.; FACÓ, O.; LÔBO, A.B.O.; VILLELA, L.V. Brazilian goat breeding programs. **Small Ruminant Research**, v.89, n.2/3, p.149-154, 2010.

MAGALHÃES, K.A.; MARTINS, E.C.; HOLANDA FILHO, Z.F.; DE LUCENA, C.C. Pesquisa Pecuária Municipal 2017: efetivo dos rebanhos caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2018.

MAIA, L.C.P.; BRITO, B.F.; SANTOS, B.M.B; CABRAL; L.A.R; SALGUEIRO, C.C.M; MATTA, M.F.R.; NUNES, J.F. Aspectos econômicos e avaliação do período de viabilidade de espermatozoides ovino imunossexados e diluídos em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.48, p.17-40, 2020.

MATTA, C.G.F. **Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento**, 2003. 55p. (Tese de Doutorado em Produção Animal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes/RJ, 2003.

MATTA, M.F.R. **Método para sexagem de espermatozoides usando a via clássica do sistema complemento, com eliminação da via alternativa pela inativação da proteína “b”**. 2000. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Patente N/Ref.: PI 0005045-8 A2.

MCMANUS, C.; HERMUCHE, P.; PAIVA, S.R.; DALTRO, D.; ALFONZO, E.M.; FACO, O. Distribution of goat breeds in Brazil and their relationship with environmental controls. **Bioscience Journal**, v.30, n.6, p.1819-1836, 2014.

ONU. United nations, department of economic and social affairs. **The United Nations, Population Division, Population Estimates and Projections Section**, 2012.

OSÉS, M.V.; TERUEL, M.T.; CABODEVILA, J.A.; Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. **Revista Veterinária**, v.20, n.2, p.138-145, 2009.

PARKINSON, T.J.; MORREL, J.M. Artificial Insemination In: NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 10. ed. Saunders Ltd, 2019. p.746-777.

SAATH, K.C.O.; FACHINELLO, A.L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.56, n.2, p.195-212, 2018.

SCOTT, C.; SOUZA, F.F.; MOTHÉ, G.B.; ARISTIZABAL, V.H.V.; JUNIOR, J.A.D. Estudo sobre as diferentes técnicas de espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, v.25, n.1, p.21-29, 2018.

SEIDEL JR, G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.443-446, 2007.

SEIDEL JR, G.E.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v.124, n.6, p.711-714, 2002.

SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v.71, n.1, p.4-10, 2009.

SOUZA, C.J.P.; SOUZA, C.J.P.; MATTA, M.F.R.D.; CRUZ, G.M.; ALVES, E.W.; KANASHIRO, M.M.; SILVA, J.F.S. Anticorpo monoclonal contra uma proteína macho-específica de 19 kDa em espermatozoides bovinos: uma metodologia promissora para imunosexagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.1, p.74-78, 1999.

THOMAS, J.M.; LOCKE, J.W.C.; VISHWANATH, R.; HALL, J.B.; ELLERSIECK, M.R.; SMITH, M.F.; PATTERSON, D.J. Effective use of Sexed ULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers **Theriogenology**, v.98, n.1, p.88-93, 2017.

TILBURG, M.F.V.; MACHADO, O.L.T.; SILVA, J.F.S.; MATTA, C.G.F.; FAGUNDES, B.; MATTA, M.F.R. Identificação de antígeno macho-específico de ovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, n.559/560, p.231-233, 2006.

VILLADIEGO, F.A.C.; GUIMARÃES, J.D.; DA COSTA, E.P.; ÁLVAREZ, J.A.C.; LEÓN, V.H.G.; LÓPEZ, C.J.R. Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración. **Revista Medicina Veterinária**, n.36, p.121-133, 2018.

WACHTELL, S.S.; OHNO, G.C.; KOO, G.C.; BOYSE, E.A. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of Sex. **Nature**, v.257, n.5523, p.235-236, 1975.