

## POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA SEXAGEM ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO ANIMAL

*(Biotechnological potential of sex-sorting sperm in animal production)*

Ellen Cordeiro Bento da SILVA<sup>1\*</sup>; Maria Madalena Pessoa GUERRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPe);

<sup>2</sup>Dpto de Medicina Veterinária (UFPe). Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Bairro Dois Irmãos. CEP: 52171-900, Recife, PE. \*E-mail: [silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

### RESUMO

A predeterminação do sexo da progênie é um desejo entre os criadores, uma vez que permite o direcionamento do sexo dos animais nascidos, segundo a finalidade do sistema de produção. Com a descoberta dos cromossomos sexuais X e Y, estudos para a pré-seleção do sexo seguiram um direcionamento científico, a fim de desenvolver técnicas para a separação das populações de espermatozoides portadores destes cromossomos. Com esta finalidade foi desenvolvido e aprimorado o método de separação em citômetro de fluxo, que é de alta precisão, embora apresente custo elevado e cause injúrias aos espermatozoides. Por conseguinte, protocolos alternativos vêm sendo buscados para viabilizar a sexagem espermática, sem maiores prejuízos estruturais e funcionais aos gametas, no que se destacam os gradientes de densidade de Percoll<sup>®</sup>. Em decorrência do potencial biotecnológico da sexagem espermática, visando maximizar a produção animal, foi objetivado com esta revisão expor os pontos positivos e negativos das duas principais técnicas usadas para este fim.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo, gradientes de densidade, injúrias, Percoll, populações espermáticas.

### ABSTRACT

The predetermination of progeny sex is a desire among breeders, since it allows the sexing of born animals according the purpose of the production system. With the discovery of the sex chromosomes X and Y, the sex pre-selection studies followed a scientific direction, in order to develop techniques for the separation of sperm populations with these chromosomes. For this purpose it was developed and improved the flow cytometer separation method, which is highly accurate, although presenting a high cost and causing sperm injuries. Therefore, alternative protocols have been sought to enable sperm sexing, without major structural and functional damage to gametes, with emphasis on Percoll<sup>®</sup> density gradients. Due to the biotechnological potential of sperm sexing, in order to maximize the animal production, it was objectified in this review expose the positive and negative points of the two main techniques used for this purpose.

**Key words:** Flow cytometry, density gradients, injuries, Percoll, sperm populations.

### INTRODUÇÃO

O setor agropecuário contribui significativamente para a geração do produto interno bruto (PIB) brasileiro e a consolidação da economia deste país (MAPA, 2017). Neste

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

sentido, o uso de biotecnologias para a otimização do manejo reprodutivo e da produtividade animal é, incessantemente, alvo de estudos científicos (SAKASHITA *et al.*, 2012).

Dentre as biotécnicas da reprodução mais utilizadas encontram-se a inseminação artificial (IA), a criopreservação de gametas, a superovulação, a transferência de embriões, a recuperação de oócitos e a fertilização *in vitro*. Em adição, estão em expansão na indústria pecuária a clonagem, a transgenia, a biologia de células tronco e a sexagem de espermatozoides e embriões (VIEIRA, 2012).

Desde a descoberta dos cromossomos sexuais X e Y, surgiu o desejo pela sexagem dos espermatozoides e, conseqüentemente, de estudos para o desenvolvimento de técnicas viáveis de separação das populações espermáticas (JOHNSON, 1995; SEIDEL Jr., 2007). Isso porque, por meio da sexagem espermática o sexo da prole pode ser predeterminado e direcionado segundo a aptidão do rebanho (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; KLINC e RATH, 2007), potencializando o ganho genético, facilitando o manejo e aumentando os lucros da criação (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas desenvolvidas para a sexagem de espermatozoides destacam-se a citometria de fluxo (SEIDEL Jr., 2003) e os gradientes de densidade de Percoll® (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Assim, em virtude do potencial biotecnológico da sexagem espermática para a produção animal, foi objetivado com esta revisão expor os pontos favoráveis e desfavoráveis da separação espermática por citometria de fluxo e gradientes de densidade de Percoll®.

## DESENVOLVIMENTO

### Sexagem espermática

A predeterminação do sexo da progênie é uma biotécnica muito desejada pelo setor pecuário (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; SEIDEL Jr, 2003; WHEELER *et al.*, 2006) e que contribui para o aumento da eficiência mundial na produção de alimentos (ABDULLAH *et al.*, 2008). Em mamíferos, diferentes rotas tecnológicas têm sido seguidas neste sentido (HOSSEPIAN de LIMA, 2007), como a determinação do sexo de embriões pré-implantação e a sexagem espermática (MURTA *et al.*, 2013). Contudo, esta última biotecnologia se sobressai em virtude da maior praticidade e da inexistência de limitações éticas (JOHNSON, 2000).

Por conseguinte, a sexagem de espermatozoides é uma técnica de grande importância econômica entre as espécies de interesse zootécnico (HABERMANN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O uso do sêmen sexado permite o direcionamento do rebanho, de acordo com sua aptidão produtiva (HABERMANN *et al.*, 2005; HOSSEPIAN de LIMA, 2007; KLINC e RATH, 2007), e a conseqüente maximização do ganho genético (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; MURTA *et al.*, 2013), produtividade e lucratividade (HABERMANN *et al.*, 2005; HOSSEPIAN de LIMA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

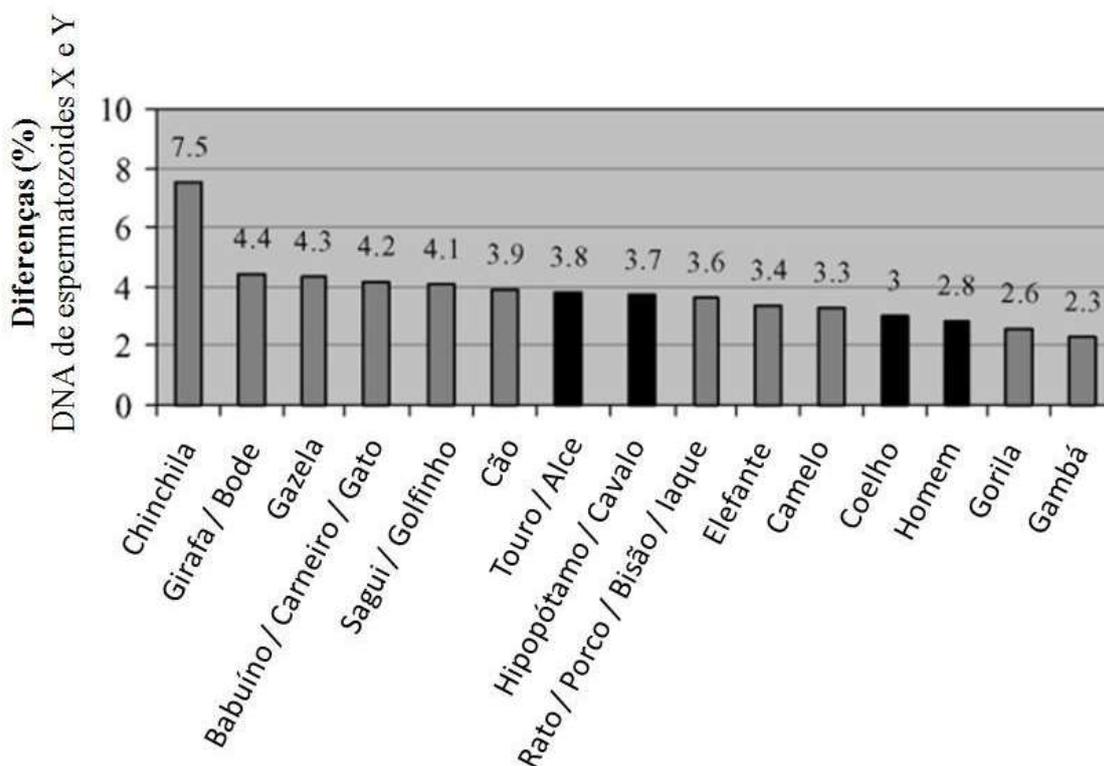
Com base no exposto, o uso do sêmen sexado, em associação a outras biotecnologias da reprodução, tem sido proposto como uma forma de aumentar a eficiência produtiva de rebanhos, como os caprinos, em termos biológicos e econômicos (PARRILLA

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

*et al.*, 2004). Contudo, vale ressaltar que a aplicação prática deste material biológico depende do custo benefício, resultados de fertilidade, eficiência e facilidade do seu uso (JOHNSON, 2000; MAXWELL *et al.*, 2004).

Como o sexo dos mamíferos é determinado pelos cromossomos sexuais X e Y, presentes nos espermatozoides (GARNER, 2001), muitas técnicas de sexagem têm sido propostas com base nas diferenças químicas e físicas, existentes entre estas duas populações (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; MURTA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O parâmetro a ser utilizado como base para a separação espermática deve ter baixa variação biológica, o que é determinante para a pureza e rendimento da amostra (VAN MUNSTER *et al.*, 1999). Este é um fator limitante e responsável pelos resultados conflitantes, devido à incapacidade de separar os espermatozoides X e Y por muitas metodologias desenvolvidas (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996).

Até o momento, a constituição cromossômica e, conseqüentemente, o conteúdo de DNA é a única diferença, estabelecida e validada cientificamente, em que podem ser baseados os métodos para a separação eficiente de espermatozoides X e Y *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O conteúdo de DNA difere entre os cromossomos sexuais, em graus variáveis, de acordo com as espécies (Fig. 01) (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001).



**Figura 01:** Diagrama com as diferenças no conteúdo de DNA entre os cromossomos sexuais X e Y em diferentes espécies. (Fonte: Adaptada de Garner, 2006 e Parrilla *et al.*, 2004)

Na espécie caprina, por exemplo, a diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozoides X e Y é de 4,4%, o que permite a precisa identificação das duas populações e torna a técnica de sexagem atrativa para esses animais (PARRILLA *et al.*, 2004). Em contrapartida, estas técnicas e o uso do sêmen sexado ainda precisam ser introduzidos na

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

caprinocultura (ALEXANDER *et al.*, 2010), sendo os relatos existentes ainda muito restritos (BATHGATE *et al.*, 2013; SUREKA *et al.*, 2013). Tal fato pode ser justificado pelo alto custo da metodologia comercialmente vigente (EVANS *et al.*, 2004; MURTA *et al.*, 2013), o que tem determinado a busca pelo desenvolvimento de metodologias alternativas (SUREKA *et al.*, 2013).

Para que a técnica de sexagem de espermatozoides passe a ser amplamente aceita e adotada, não deve danificar os gametas e nem comprometer a fertilidade; deve permitir a congelação do sêmen, ter acuidade de separação de espermatozoides X e Y próximo a 100% e determinar mínimas perdas espermáticas (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; HABERMANN *et al.*, 2005). Além disso, a técnica deve ser reproduzível, simples, rápida e de baixo custo para permitir sua difusão no mercado (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Entretanto, embora nenhum método existente consiga reunir todas as condições necessárias para sua utilização, os métodos do citômetro de fluxo e da centrifugação em gradientes de densidade se destacam (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2003; HOSSEPIAN de LIMA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013), enquanto que outras técnicas foram abandonadas (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

### **Sexagem em citômetro de fluxo**

A sexagem em citômetro de fluxo é o método de separação física de espermatozoides que tem hoje o maior reconhecimento (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Essa metodologia se baseia na diferença entre o conteúdo de DNA de espermatozoides portadores dos cromossomos sexuais X e Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; JOHNSON, 2000; SHARPE e EVANS, 2009), conforme anteriormente descrito (Fig. 01). Assim sendo, quanto maior a diferença entre o conteúdo de DNA, mais eficientemente as subpopulações de espermatozoides são identificadas e separadas (MAXWELL *et al.*, 2004).

Até o momento, a sexagem por citômetro de fluxo é a única metodologia que permite o real enriquecimento das amostras com espermatozoides X ou Y (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996; JOHNSON, 2000; MURTA *et al.*, 2013). Portanto, este é o único método completamente validado para a pré-seleção do sexo de mamíferos (JOHNSON, 2000), sendo considerado como de referência (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003) e, por isso, comercialmente disseminado. Por meio desta técnica, a separação de espermatozoides X e Y atinge pureza superior a 85% (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001; MAXWELL *et al.*, 2004).

A técnica de sexagem por citometria de fluxo baseia-se na coloração diferencial dos espermatozoides, emissão de raios laser e forças hidrodinâmicas que direcionam os gametas durante a separação (MURTA *et al.*, 2013). Assim, após excitação pelo laser ultravioleta (UV), os espermatozoides corados com fluorocromo específico para DNA (HOECHST 33342) têm a quantidade do material genético mensurada (SHARPE e EVANS, 2009). Como a quantidade de DNA difere entre as subpopulações X e Y, a intensidade de fluorescência também difere, permitindo a identificação e separação dos gametas (JOHNSON, 2000; GARNER, 2001).

Apesar das vantagens, a sexagem em citômetro de fluxo é um procedimento de alto custo, sofisticado (EVANS *et al.*, 2004; MURTA *et al.*, 2013) e sem portabilidade,

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

necessitando de equipamento caro e mão de obra qualificada para ser realizado (EVANS *et al.*, 2004). Além disso, este é um processo lento (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; MAXWELL *et al.*, 2004; WHEELER *et al.*, 2006), permitindo a separação de apenas  $6 \times 10^6$  espermatozoides de cada subpopulação (X e Y) por hora ou  $18 \times 10^6$  espermatozoides por hora (JOHNSON, 2000; ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Conseqüentemente, visando atingir custo-benefício, a dose inseminante com sêmen sexado contém baixa concentração espermática (cerca de 2,5 milhões de células) (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; EVANS *et al.*, 2004).

Adicionalmente, o processo de sexagem em citômetro pode causar danos irreversíveis aos gametas masculinos e ao seu DNA, com conseqüente comprometimento da fertilidade e da produção de embriões viáveis (MAXWELL *et al.*, 2004; De JARNETTE *et al.*, 2011; MURTA *et al.*, 2013). Isso porque, apesar das células danificadas serem eliminadas durante o processo de separação, as que sobrevivem têm menor tempo de vida (MAXWELL *et al.*, 2004; GARNER, 2006). Nesse contexto, a associação entre as técnicas de sexagem e congelamento do sêmen é dificultada (MURTA *et al.*, 2013), uma vez que durante a segunda os danos gerados na primeira são potencializados (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

As possíveis causas de injúrias aos espermatozoides submetidos ao citômetro de fluxo parecem estar associadas ao uso de corantes, alta diluição, incubação por longo período, exposição à alta pressão, ao laser UV e a centrifugação após a sexagem (JOHNSON, 2000; EVANS *et al.*, 2004; MAXWELL *et al.*, 2004; GARNER, 2006). As altas taxas de diluição são responsáveis por induzir processo semelhante à capacitação, enquanto a alta pressão utilizada compromete a cinética espermática (EVANS *et al.*, 2004).

Com base no anteriormente exposto, a espécie bovina é a única em que a sexagem por citômetro de fluxo é usada comercialmente (MAXWELL *et al.*, 2004). Nos demais animais de interesse zootécnico há demanda pelo uso, mas o alto custo limita a adoção da biotecnologia (EVANS *et al.*, 2004). Assim, apesar da técnica de sexagem ser atrativa para a espécie caprina (PARRILLA *et al.*, 2004), existe apenas um relato com o uso do citômetro de fluxo para a separação de seus espermatozoides (BATHGATE *et al.*, 2013).

Bathgate *et al.* (2013) relatam que a acuidade de separação entre as subpopulações de espermatozoides caprinos X e Y foi superior a 90%, bem como estes gametas resistiram aos processos de sexagem e congelamento, com obtenção de resultado positivo, embora preliminar, após a IA. Em contrapartida, vale ressaltar que a qualidade do sêmen sexado e congelado, obtida neste estudo, foi baixa, tendo sido as médias mais altas de motilidade e viabilidade espermática de 28,83% e 41,00%, respectivamente. Além disso, a fertilidade após IA com espermatozoides X foi comprometida, tendo sido gerado apenas um produto (embora do sexo desejado) das oito inseminações realizadas, enquanto com o sêmen não sexado foram gerados quatro produtos das seis inseminações, dos quais três foram do sexo feminino.

### **Sexagem por centrifugação em gradientes de densidade de Percoll®**

Embora a sexagem em citômetro de fluxo possibilite a separação dos espermatozoides X e Y com quase 100% de pureza (JOHNSON, 2000), o método é laborioso

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

e caro (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Além disso, é prejudicial aos gametas (SEIDEL Jr e GARNER, 2002; EVANS *et al.*, 2004) e não atende à demanda do mercado (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Deste modo, métodos alternativos mais simples (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; RESENDE *et al.*, 2009), baratos, menos nocivos (EVANS *et al.*, 2004) e que permitam a congelação dos espermatozoides, sem redução da fertilidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011), têm sido buscados.

Dentre as metodologias alternativas, a centrifugação de espermatozoides através de meios de densidade crescente (gradientes), tais como os de Percoll<sup>®</sup>, permitem a separação dos gametas portadores de cromossomos sexuais X e Y (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; HOSSEPIAN de LIMA, 2003). O Percoll<sup>®</sup> é constituído de partículas de sílica coloidal (15-30nm de diâmetro), coberta com polivinilpirrolidona (PVP) (CHEN e BONGSO, 1999; SAMARDŽIJA *et al.*, 2006) e é utilizado para a preparação de soluções isotônicas com diferentes densidades (OLIVEIRA *et al.*, 2011; LUCIO *et al.*, 2012). Tais soluções, quando depositadas em tubos de poliestireno, da maior para a menor densidade, formam o gradiente de densidade (OLIVEIRA *et al.*, 2011; RESENDE *et al.*, 2011; LUCIO *et al.*, 2012).

Os gradientes de densidade de Percoll<sup>®</sup> podem ser descontínuos (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; LUCIO *et al.*, 2012) ou contínuos (RESENDE *et al.*, 2010; RESENDE *et al.*, 2011). O gradiente descontínuo é formado por camadas com densidades predeterminadas e evidentes, enquanto que no gradiente contínuo há aumento gradual e suave da densidade da porção superior à inferior (PERTOFT, 2000), o que é possível a partir da estocagem do gradiente descontínuo a 4 °C durante 24 horas (RESENDE *et al.*, 2009; RESENDE *et al.*, 2010). Pelo fato do gradiente contínuo poder ser estocado, o uso da metodologia de centrifugação em gradientes de densidade é facilitado (RESENDE *et al.*, 2011).

Para efeito da sexagem, em gradiente descontínuo ou contínuo, o sêmen é depositado sobre o gradiente e submetido à centrifugação em rotor horizontal (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RESENDE *et al.*, 2011; LUCIO *et al.*, 2012). Após centrifugação, os espermatozoides portadores do cromossomo X tendem a se depositar no fundo do gradiente, enquanto os portadores do cromossomo Y ficam dispersos ao longo deste (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011). Isso ocorre porque as células X possuem mais DNA e nucleoproteínas do que as Y, ou seja, maior densidade (HOSSEPIAN de LIMA, 2007; HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011), visto que o DNA é responsável por 18% da massa da célula (HOSSEPIAN de LIMA, 2007).

Além de realizar a separação com base nos cromossomos sexuais (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2000; HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2003), o gradiente de Percoll<sup>®</sup> também é capaz de selecionar os espermatozoides quanto a viabilidade (SAMARDŽIJA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Na fração mais densa do gradiente são retidos os gametas de melhor qualidade e com desvio para o cromossomo X, enquanto na parte superior ficam as impurezas, tais como células imaturas, anormais e imóveis. Portanto, é provável que a taxa de recuperação espermática, obtida após a centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup>, sofra influência da qualidade da amostra de sêmen inicial (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

Resultados satisfatórios com a centrifugação em gradiente de densidade foram obtidos por Hossepián de Lima *et al.* (2000 e 2011) para a sexagem de espermatozoides bovinos em gradiente descontínuo de Percoll®. Estes autores obtiveram acuidade de separação em torno de 75%, com repetitividade de 70% e taxa de recuperação espermática de 25% na fração inferior do gradiente. Tal fato evidencia o potencial uso do sêmen sexado em gradientes de densidade associado a biotécnicas da criopreservação e inseminação artificial, sem comprometimento da taxa de fertilidade (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2015). Apesar disso, os resultados obtidos com esta técnica de separação ainda são inconstantes, sendo observada, em sua maioria, baixa acuidade (ANDERSEN e BYSKOV, 1997; LIN *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2004; RESENDE *et al.*, 2011; LÚCIO *et al.*, 2012).

Por conseguinte, embora os gradientes de densidade de Percoll® possam ser empregados para a pré-seleção do sexo feminino, em geral, isso é feito de forma discreta e insuficiente para influenciar, significativamente, o sexo ao nascimento (FLAHERTY e MATTHEWS, 1996). Isto demonstra a necessidade de aprimorar esta técnica, em termos de acuidade e da taxa de recuperação espermática, que são relativamente baixas (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Assim, a mesma se tornará viável comercialmente, nos mais variados setores da produção animal (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011), deixando o uso do sêmen sexado de ser restrito à bovinocultura.

A busca pelo aperfeiçoamento da metodologia de centrifugação em gradiente de Percoll® é justificável, com base em seu potencial para a seleção do sexo e relativo baixo custo (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2004; HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2015). Associado a isso, a passagem através do gradiente de Percoll® melhora a cinética, a viabilidade e a porcentagem de espermatozoides normais, em relação às amostras originais (CHEN e BONGSO, 1999; SAMARDŽIJA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Apesar da menor acuidade e taxa de recuperação, a produtividade obtida por meio da centrifugação em gradiente de Percoll® é superior à do citômetro de fluxo (HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2011) e o uso do sêmen resultante não compromete a taxa de clivagem e de blastocistos formados *in vitro*, bem como a de prenhez após a inseminação artificial (RESENDE *et al.*, 2009; HOSSEPIAN de LIMA *et al.*, 2015).

Embora em menores proporções, a centrifugação em gradientes pode gerar danos aos espermatozoides, diminuindo a resistência destes ao processo de congelação (HOSSEPIAN de LIMA, 2007). Contudo, nessa técnica os danos espermáticos são mais restritos ao acrossoma, o que foi correlacionado ao uso do sêmen congelado-descongelado durante o procedimento (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em adição, também pode ser induzida a capacitação espermática (MATÁS *et al.*, 2011), fato este que compromete a resistência dos gametas durante a sua congelação (HOSSEPIAN de LIMA, 2007).

Pelo exposto, é necessária a realização de pesquisas a fim de aprimorar o método de centrifugação em gradiente de densidade de Percoll®, de modo a incorporar estratégias que previnam a geração de danos aos espermatozoides durante o transporte, processamento e congelação (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Tal necessidade se deve ao fato da congelação de sêmen, em associação à técnica de sexagem espermática, ser de grande importância comercial, uma vez que permite a ampla utilização deste material biológico (JOHNSON, 2000).

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

Em termos gerais, o uso de gradientes de densidade é ainda vantajoso em relação à citometria, visto que não apenas a acuidade de separação deve ser considerada, mas também a viabilidade dos espermatozoides. Além disso, é válido ressaltar que, para condições heterogêneas como as do Brasil, talvez seja mais viável optar-se por uma metodologia de baixo custo e com acuidade em torno de 75%, mas que permita obter índices de fertilidade satisfatórios, nas variadas condições de manejo (HOSSEPIAN de LIMA, 2007).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do exposto pode-se constatar que as técnicas de sexagem demandam aprimoramentos para que sejam mais eficazes e menos deletérias aos espermatozoides, com favorecimento aos processos de conservação dos gametas. Neste sentido, a técnica de gradiente de Percoll<sup>®</sup> necessita de progressos quanto a acurácia e a repetitividade, enquanto a de citometria de fluxo precisa ter seu uso ampliado entre as espécies de interesse zootécnico, seu custo reduzido e tornar-se menos prejudicial aos espermatozoides.

### REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.B.; KHADIJAH, W.E.W. RAHMAN, A.N.M.A. A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. *Biotechnology*, v.7, n.2, p.371-384, 2008.
- ALEXANDER, B.; MASTROMONACO, G.; KING, W.A. Recent advances in reproductive biotechnologies in sheep and goat. *Journal of Veterinary Science and Technology*, v.1, n.1, p.1-8, 2010.
- ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de separação de espermatozoides para escolha do sexo dos animais domésticos. *Boletim de Indústria Animal*, v. 0, n.1, p.107-115, 2003.
- ANDERSEN, C.Y.; BYSKOV, A.G. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v.76, n.2, p.131-134, 1997.
- CHEN, M.J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction*, v.14, n.3, p.759-764, 1999.
- DeJARNETTE, J.M.; LEACH, M.A.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MCCLEARY, C.R.; MORENO, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science*, v.94, p.3477-3483, 2011.
- EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.C. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.455-464, 2004.

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

FLAHERTY, S.P.; MATTHEWS, C.D. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Molecular Human Reproduction*, v.2, n.12, p.937-942, 1996.

GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *Journal of Andrology*, v.22, n.4, p.519-526, 2001.

GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v.65, p.943-957, 2006.

HABERMANN, F.A.; WINTER, A.; OLSAKER, I.; REICHERT, P.; FRIES, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.122, n.1, p.22-27, 2005.

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.480, 2000.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; RAMALHO, M.F.P.D.-T. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de “sêmen sexado” congelado. BR PI 0300604-2, v.17, 2003.

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.

HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.8, p.1680-1685, 2011.

HOSSEPIAN de LIMA, V.; RAMALHO, M.F.D.-T.; ALVES, B.C.A.; LUCIO, A.C.; OLIVEIRA, L.Z.; MOREIRA FILHO, C.A.; CARNEIRO, L.C. Enrichment of bovine semen with x-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. *Animal and Veterinary Sciences*, v.3, n.1, p.1-7, 2015.

JOHNSON, L.A. Sex preselection by flow cytometry separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, n.4, p.893-903, 1995.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.93-107, 2000.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, n.1, p.63-67, 2007.

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.

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)

LIN, S.P.; LEE, R.K.K.; TSAI, Y.J.; HWU, Y.M.; LIN, M.H. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.15, n.9, p.565-569, 1998.

LUCIO, A.C.; RESENDE, M.V.; DERNOWSECK-MEIRELLES, J.A.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; MIGUEL, M.C.V.; CARMO, A.S.; TOMITA, S.Y.; ALVES, B.C.A.; FAZANO, F.A.T.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.3, p.525-532, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). *Projeções do Agronegócio – Brasil 2016/17 a 2026/27: Projeções de Longo Prazo*. 8ª ed., Brasília: SPA/MAPA, 2017, 123p.

MATÁS, C.; VIEIRA, L.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; AVILÉS-LÓPEZ, K.; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; CARVAJAL, J.A.; GADEA, J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal Reproduction Science*, v.127, n.1-2, p.62-72, 2011.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M.; GILLAN, L.; MORTON, K.M.; O'BRIEN, J.K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.79-95, 2004.

MURTA, D.V.F.; GOMES, V.C.L.; MARTINEZ, L.C.R. Uso de sêmen sexado em bovinos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.11, n.20, p.1-16, 2013.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.1, p.41-48, 2011.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.; DE ANDRADE, A.F.; PERINI, A.P.; RESENDE, M.V.; MIGUEL, M.C.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia*, v.44, n.1, p.9-15, 2012.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*. 1ª ed. São Paulo: Med Vet, 2013, 305p.

PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Flow cytometry identification of X and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.39, p.58-60, 2004.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.44, p.1-30, 2000

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, 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.

RESENDE, M.V.; LÚCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; LIMA, V.F.M.H. Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.11, n.1, p.260-269, 2010.

RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; OLIVEIRA, L.Z.; ALMEIDA, A.O.; ALVES, B.C.A.; MOREIRA-FILHO, C.A.; SANTOS, I.W.; HOSSEPIAN de LIMA, V.F.M. Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.3, p.544-551, 2011.

SAKASHITA, S.M.; RODRIGUES, C.F.C.; RODELLO, L.; MONTEIRO, C.D.; IAPICHINI, J.E.C.B. Inseminação artificial em caprinos: Associação das biotécnicas de diluição e refrigeração do sêmen. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.6, n.14, p.1-21, 2012.

SAMARDŽIJA, M.; DOBRANIĆ, T.; KARADJOLE, M.; GETZ, I.; VINCE, S.; GRAČNER, D.; MAČEŠIĆ, N.; FILAKOVIĆ, I. The efficacy of gradient Percoll<sup>®</sup> on bull sperm separation for in vitro fertilization. *Veterinarski Archiv*, v.76, n.1, p.37-44, 2006.

SEIDEL JR, G.E.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, v.124, p.733-743, 2002.

SEIDEL JR, G.E. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal Reproduction Science*, v.79, n.3, p.145-156, 2003.

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

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

SUREKA, P.; NILANI, K.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. Sex Pre-selection by Quantification of Y-Chromosome bearing spermatozoa in goat sperm. *International Journal of Scientific and Research Publications*, v.3, n.1, p.1-4, 2013.

VAN MUNSTER, E.B.; STAP, J.; HOEBE, R.A.; TE MEERMAN, G.J.; ATEN, J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X and Y bearing spermatozoa: potentials and limitations. *Theriogenology*, v.52, p.1281-1293, 1999.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p.55-65, 2012.

WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.219-227, 2006.

\*Endereço para correspondência:  
[silva.ecb@gmail.com](mailto:silva.ecb@gmail.com)