

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BRUNA RODRIGUES WILLHELM

SEXAGEM DE SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA APLICABILIDADE EM
ANIMAIS SELVAGENS

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SEXAGEM DE SÊMEN POR CITOMETRIA DE FLUXO E SUA APLICABILIDADE EM
ANIMAIS SELVAGENS

Autora: Bruna Rodrigues Willhelm

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Veterinária, como requisito parcial
para graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Profa. Ender Rosana Oberst

Porto Alegre

2014

RESUMO

Este trabalho visa sintetizar o conhecimento construído até o momento sobre a sexagem seminal e sua aplicação para a otimização do desempenho reprodutivo, como ferramenta para a conservação de espécies selvagens. Para tal foi realizada uma revisão bibliográfica. Periódicos foram buscados em bancos de dados como *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), Scopus, *Direct Science* e Google Acadêmico com palavras chaves como “sorted semen” e “sexed semen” somados a “wildlife”, entre outras. A partir deste método foram encontradas 45 espécies, entre domesticadas e selvagens, com algum tipo de pesquisa relacionada à sexagem seminal. Concebeu-se, então, uma retomada das técnicas mais utilizadas para a separação do sêmen em populações portadoras de X e Y, abrangendo a sexagem por gradiente de Percoll, imunologia, mas principalmente, a citometria de fluxo, seu histórico e funcionamento. A seguir foram expostas as necessidades de se buscar um protocolo espécie-específico, bem como o desenvolvimento de técnicas auxiliares. Posteriormente enunciam-se alguns tópicos mais técnicos na sexagem e a sua situação para animais ameaçados de extinção, apresentou-se a realidade do congelamento do sêmen sexado e por último citamos a fertilidade e as reduzidas taxas de prenhes, bem como as possíveis causas e danos gerados aos espermatozoides. Concluiu-se, finalmente, que esse ramo necessita de maior investimento em pesquisa para que a tecnologia possa ser adaptada as diferentes espécies e, assim, gerar filhotes.

Palavras-chaves: Sexagem seminal. Citometria de fluxo. Espécies ameaçadas.

ABSTRACT

This paper aims to synthesize the knowledge built to date on the seminal sexing and its application to optimize the reproductive performance, as a tool for conservation of unconventional species. For this, the literature was reviewed. Journals were searched in databases such as NCBI, Scopus, Science Direct and Google Scholar with key words like "sorted semen" and "sexed semen" added the "wildlife", among others. From this method were found 45 species, including domesticated and wild, with some kind of research related to seminal sexing. It is conceived then a resumption of the techniques used for separating sperm bearing populations of X and Y, covering sexing by Immunology, but mainly flow cytometry, its history and operation. Next were exposed needs to get a species-specific protocol and the development of supporting techniques. Subsequently were enunciate some topics more technical in sexing and their situation for endangered animals, the reality of the freezing of sexed semen were presented and finally fertility and reduced pregnant rates were mention as well as their possible causes and sperm damage. It was concluded finally, that this area of knowlege needs more investment in research so this technology can be adapted to the different species and thus generate offspring.

Keyword: *Sexed semen. Sorted semen. Flow cytometry. Endangered species.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação de um citômetro de fluxo adaptado para sexagem seminal.. 14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Perissodactyla.....	22
Tabela 2-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Proboscidea.....	23
Tabela 3-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Artiodactyla.....	24
Tabela 4-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Primata.....	26
Tabela 5-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Carnivora.....	27
Tabela 6-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Cetacea.....	28
Tabela 7-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Rodentia.....	29
Tabela 8-	Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Diprotodontia.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	METODOLOGIA.....	9
3	TIPOS DE SEXAGEM SEMINAL.....	10
3.1	Sexagem utilizando gradiente de Percoll.....	10
3.2	Sexagem por imunologia.....	11
3.3	Sexagem por citometria de fluxo.....	12
3.3.1	Citômetro de fluxo.....	12
3.3.2	Adaptações feitas no citômetro de fluxo.....	15
3.3.3	Histórico.....	16
4	EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO POR CITOMETRIA.....	18
4.1	Rapidez e eficiência.....	18
4.2	Posição correta da célula na leitura.....	19
4.3	Utilização de corante.....	20
4.4	Índice de separação espermática.....	20
5	IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLOS ESPÉCIE- ESPECÍFICOS.....	22
5.1	Desenvolvimento de novos protocolos.....	31
6	RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DO SÊMEN SEXADO.....	33
7	FERTILIDADE E TAXA DE PREENHEZ DE SÊMEN SEXADO.....	35
7.1	Dano espermático gerado durante a sexagem	36
7.2	As causas de baixa fertilidade não relacionadas ao processo de sexagem.....	37
7.3	Uso de outras biotecnologias reprodutivas para incrementar os índices de fertilidade.....	37
8	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A *Red list* 2014, publicada pela *Species Survival Commission* (INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES, 2014), permite entender a magnitude das consequências da interferência humana no ambiente natural. Nela foram catalogados 2.464 espécies de animais criticamente ameaçadas, das quais 213 são mamíferos. Essa lista mostra também 77 espécies de mamíferos que foram completamente extintos nos últimos anos, e somente dois destes têm a possibilidade de reintrodução na natureza através de programas *ex situ* (envolve populações não naturais, utilizando animais de cativeiro).

Estratégias de conservação *in situ* (manutenção e recuperação de populações viáveis em seus meios naturais) possibilitam a manutenção de populações animais em ambientes adaptados. Entretanto, algumas vezes, esses esforços são insuficientes para o sustento da diversidade genética adequada de uma comunidade saudável. Assim, novos métodos de conservação foram desenvolvidos, utilizando técnicas de reprodução assistida (ART), tais como criopreservação de gametas, sexagem seminal e inseminação artificial, entre outros (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

A manutenção de uma população reprodutiva saudável exige grupos sociais de tamanho, genética e proporção de fêmeas e machos apropriados. Este último requisito é particularmente importante para espécies com estruturas sociais dominadas por somente um sexo, ou quando a interação entre os sexos é passageira e restrita a estações reprodutivas. O manejo de grupo é mais bem realizado quando apresenta a proporção sexual semelhante à encontrada na natureza. No entanto essa proporção é raramente atingida por meio de acasalamentos naturais, uma vez que produzem números equivalentes de machos e fêmeas (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Esse desequilíbrio cria dificuldades para o manejo de populações pequenas, principalmente em mamíferos grandes com reprodução lenta (HERMES; GO, 2007).

A separação dos espermatozoides de um ejaculado em populações contendo células portadoras do cromossomo X ou Y por citometria de fluxo é uma tecnologia em crescimento e bem aceita no mercado, com resultados comprovados e nascimento de filhotes saudáveis em diversas espécies (MAXWELL *et al.*, 2004). O uso desse material biológico para inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV) e posterior transferência embrionária (TE)

apresenta uma oportunidade para predeterminar o sexo da progênie, permitindo melhorias no manejo de espécies ameaçadas (BEHR *et al.*, 2009a; O'BRIEN *et al.*, 2005a).

A fim de atingir esses avanços, a técnica deve ser incorporada em programas de reprodução em cativeiro e em conjunto com o gerenciamento genético apropriado. Permite a otimização do desempenho reprodutivo e, concomitantemente, ir ao encontro das necessidades sócio específicas para cada espécie (O'BRIEN *et al.*, 2005a). Adicionalmente, proporciona uma ferramenta para balancear proporções de sexos distorcidas, solucionando problemas como o excedente de machos (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Garante, ainda, o mínimo endocruzamento (GARNER, 2006), mantendo o pool genético (BEHR *et al.*, 2009a) e finalmente acelera o crescimento populacional com o auxílio de progênie essencialmente feminina, o que representa uma oportunidade particularmente atraente em espécies de reprodução lenta como é o caso de elefantes e rinocerontes (BEHR *et al.*, 2009b; MAXWELL *et al.*, 2004).

2 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão da literatura para procurar artigos científicos publicados nos bancos de dados internacionais tais como: *National Center of Biotechnology Information*, *Web of Science*, Scopus, Google Acadêmico. Tentou-se buscar livros na biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS, mas nenhum volume foi encontrado que abordassem o assunto de forma satisfatória. Foram levados em consideração trabalhos publicados entre os anos de 1989 até 2014. Utilizaram-se palavras chaves tais como: “*sexed*”, “*sorted*”, “*sexing*”, “*sorting*” associadas com “*semen*” ou “*sperm*”. Esses termos foram, ainda, complementados com outros como “*wildlife*”, “*mammalian*”, “*endangered*” e em alguns casos com o nome de um animal específico como “*llama*”, “*dolphins*”, “*elephant*”, entre outros. Diversos artigos foram utilizados, na maioria em sua íntegra, entretanto resumos foram aceitos quando não se teve acesso ao trabalho completo. Incluíram-se nessa revisão artigos originais e outras revisões da literatura.

3 TIPOS DE SEXAGEM SEMINAL

A sexagem seminal, como visto anteriormente, possui o potencial de melhorar a vida em cativeiro por simplificar o manejo sexual de populações em espaços restritos. Uma maneira comum de pré-determinar o sexo da progênie é separar os espermatozoides portadores do cromossomo X (feminino) daqueles que portam o Y (masculino). Diversos métodos foram desenvolvidos para permitir essa separação, utilizando as mais diversas características do espermatozoide. Dentre as diferenças da população X e Y pode-se utilizar as propriedades imunológicas (SANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014), as desiguais habilidades de movimentação (MADRID-BURY *et al.*, 2003), diferente separação em gradientes de albumina (MACHADO *et al.*, 2009; WOLF *et al.*, 2008) e diferente separação em percoll (MACHADO *et al.*, 2009). Entretanto, atualmente a técnica mais utilizada para separar as populações espermáticas de X e Y é baseada na diferença quantitativa no conteúdo de DNA cromossomal por citometria de fluxo (SEIDEL, 2014). Essa metodologia é o modo mais confiável e efetivo, podendo atingir mais de 90% de pureza nas amostras separadas (JOHNSON, 2000; MAXWELL *et al.*, 2004; O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009; SEIDEL, 2012). É por essa razão que esse trabalho vai se ater principalmente a esse último método.

3.1 Sexagem utilizando gradiente de Percoll

Esforços têm sido realizados para desenvolver técnicas alternativas a citometria de fluxo para a sexagem seminal. A utilização do Percoll tornaria o processo de sexagem mais simples, econômico e menos nocivo ao gameta, além de possuir uma vantagem crucial, não existe a necessidade de avaliar cada célula individualmente, vários espermatozoides podem ser sexados ao mesmo tempo. A desigualdade entre os cromossomos sexuais causa uma diferença de peso e densidade nos espermatozoides portadores de X e Y. Essa disparidade pode ser explorada para a separação dos mesmos (MACHADO *et al.*, 2009; WOLF *et al.*, 2008).

O Percoll é composto por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona (PVP). Com essa solução é possível formar gradientes com até 1.130g/mL. Existem dois tipos de gradientes possíveis de ser utilizados: o gradiente de densidade, que oferece um aumento gradual de densidade na parte superior até a porção inferior de forma linear, sem separação visível entre as camadas; existe ainda gradiente de densidade descontínuo que oferecem um

aumento no gradiente da porção superior para a inferior, com camadas bem definidas. A vantagem do primeiro modo é que esse possibilita a preparação com densidades maiores e pode ser estocado, diferentemente do gradiente descontínuo que deve ser confeccionado no momento do uso. Para a sexagem seminal, entretanto, preconizou-se a utilização do gradiente descontínuo de Percoll (RESENDE, 2007).

Quando uma camada de espermatozoide é colocada no topo de um gradiente de concentração, em contato com a porção menos concentrada, os gametas tendem penetrá-lo naturalmente. A distância de penetração vai depender da massa e da motilidade do espermatozoide. Os espermatozoides portadores do cromossomo X são mais densos e por essa razão, mais lentos e mais pesados do que os portadores de Y (MACHADO *et al.*, 2009; WOLF *et al.*, 2008). A centrifugação levaria os de maior massa para o fundo do tubo primeiro, assim, ela é usada para favorecer a separação dos portadores de X. Quanto menor o tempo de centrifugação menos tempo os portadores de Y (mais leves) tem para atingir o fundo do tubo. Somado a isso, maiores volumes de gradiente descontínuo de Percoll com concentrações elevadas tornaria mais difícil a penetração de espermatozoides mais leves, favorecendo ainda mais os gametas portadores de X (WOLF *et al.*, 2008). Madrid-Bury *et al.* (2003) utilizaram o *swim-up* a técnica juntamente com heparina para favorecimento dos portadores de X, baseando-se em uma diferença de capacitação ao invés de diferença de velocidade de movimentação.

3.2 Sexagem por imunologia

Uma alternativa à sexagem por citometria de fluxo é a separação por imunologia. Essa tecnologia baseia-se na premissa de que os espermatozoides apresentem sinais imunogênicos sexo-específicos na superfície celular. Esses são atribuídos a uma pequena quantidade de expressão genica pós-meiótica e a própria diferença cromossomal (SEIDEL, 2012). Um anticorpo específico (SSAbs) foi desenvolvido a partir de antissoro de coelho com preferência por espermatozoides contendo cromossomo X (YANG *et al.*, 2014), entretanto nesse mesmo estudo o percentual de células indiferenciadas superou os 50%, comprovando a necessidade de mais estudos para atingir parâmetros aceitáveis para uso em larga escala.

Por outro lado existem indícios que as células que expressam o sinal necessário podem apresentar danos na membrana celular. Cerca de 10% das células de um ejaculado normal exhibe tal dano. Por essa razão escolher um percentual pequeno de gametas com sinal

imunogênico pode significar escolher entre a população de membrana comprometida. Existe ainda uma grande probabilidade de tais espermatozoides serem subfêrteis (SEIDEL, 2012). No estudo de Yang *et al.* 2014 não consta a taxa de fecundidade do sêmen sexado por métodos imunológicos, contudo foram obtidos 58 embriões quatro células, provando que essa tecnologia não elimina a capacidade fecundante do gameta.

3.3 Sexagem por citometria de fluxo

Na técnica mais comumente usada o corante Hoechst 33342 (H33342) é adicionado aos espermatozoides e incubado, para permitir sua penetração (SHARPE; EVANS, 2009). O H33342 possui uma alta afinidade por DNA (SEIDEL, 2012) e é capaz de emitir uma luz fluorescente brilhante quando excitado, sem incapacitar a célula corada. Um segundo corante é adicionado para identificar as células com membrana danificada, essas serão consideradas mortas e não serão separadas (SHARPE; EVANS, 2009). Em seguida a amostra é colocada no citômetro de fluxo e o aparelho a separa em três categorias: provavelmente portadores de X, prováveis Y e finalmente os de cromossomo não determinados (SEIDEL, 2012).

3.3.1 Citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo para separação seminal é composto por um laser UV, responsável por excitar o corante H33342; dois detectores de fluorescência, também chamados de tubo fotomultiplicador, capazes de ler a luz emitida pelo corante; um bucal orientador, reguladores do posicionamento celular correto para a leitura, e um computador de alta velocidade, utilizado para processar esse sinal luminoso e classificar as células em populações de acordo com a quantidade de H33342 observada (GARNER; SEIDEL, 2008; SHARPE; EVANS, 2009).

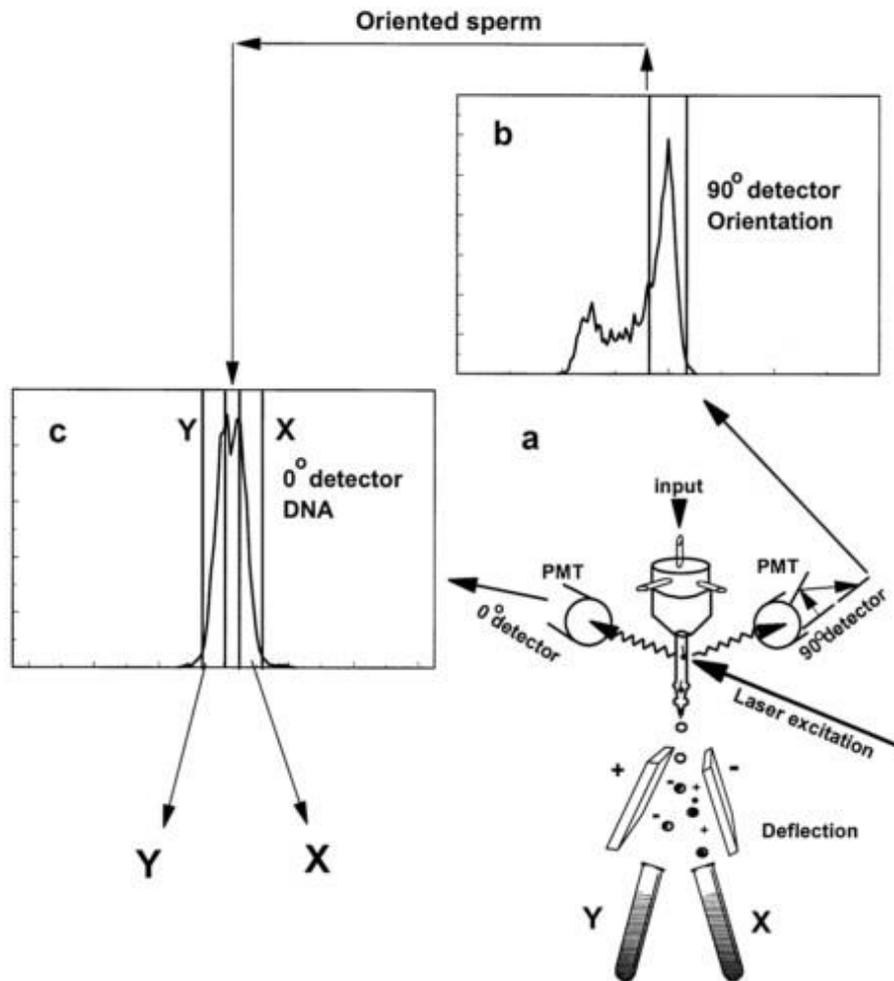
O sêmen corado é colocado na máquina, esse é bombeado em canalizações e através do bucal, as células vão, então, ser orientadas de forma correta, que consiste em: cabeça voltada para baixo, com a parte chata de frente para o detector a 0° e a lateral voltada para o detector a 90°. A seguir o fluxo passará em frente ao feixe de laser. A luz UV irá excitar o corante H33342 ligado ao DNA do gameta levando-o a emitir uma luz fluorescente azul. Essa

fluorescência é medida com um tubo fotomultiplicador na medida em que os espermatozoides passam a sua frente em fila única. A informação será então processada pelo computador, que irá classificar as células de acordo com a luminescência observada (GARNER; SEIDEL, 2008). Existem três categorias possíveis: portadores do cromossomo X, portadores de Y e determinados, onde se encontram os mal posicionados, mortos ou com coloração inadequada (SEIDEL, 2012).

Em seguida, um vibrador é utilizado para quebrar o fluxo em gotas, que em condições ideais contem um espermatozoide cada. Essas gotas são formadas em uma rapidez de 80.000 a 90.000 por segundo, enquanto o fluido está caindo a 72 Km/h. Portanto, citômetros costumam ter uma pressão de $3,5 \text{ Kg/cm}^2$, o que representa uma força considerável (SEIDEL, 2012). A gota é carregada com uma carga elétrica diferente de acordo com a classificação, X ou Y, e cai através de um campo eletromagnético, onde é atraída pela carga oposta, separando o material em cursos de água diferentes. Um terceiro feixe é formado com as células mortas ou mal posicionadas, devido à falta de carga (GARNER; SEIDEL, 2008). A Figura 1 mostra um esquema de um citômetro de fluxo adaptado a sexagem seminal baseada em Johnson *et al* 2000.

O computador gera uma série de gráficos para maior compreensão dos resultados obtidos com o processo de sexagem. O detector a 90° analisa a fluorescência da lateral da cabeça espermática e estima o percentual de células corretamente orientadas da amostra. Esse valor é demonstrado em um gráfico, o qual costuma ser representado por um único pico de células bem posicionadas. O detector a 0° analisa a parte achatada da cabeça espermática daquelas células que estão bem orientadas e avalia a quantidade de DNA baseando-se na quantidade de corante e a fluorescência emitida pelo mesmo. Esse gráfico costuma ter dois picos um representativo da população X outro da Y. Aquelas células que encontram-se na depressão entre os picos são consideradas indiferenciadas, não se pode ter certeza do seu sexo, por essa razão elas são comumente descartadas no fluxo de gametas mortos (JOHNSON, 2000). Exemplos de gráficos podem ser vistos na Figura 1.

Figura 1 - Representação de um citômetro de fluxo adaptado a sexagem seminal



Esquema de um citômetro de fluxo modificado para separação espermática. (a) O esperma entra pelo local sinalizado com “input” e então é bombeado através do bucal (peça que substitui o sistema de agulhas), representando pela forma cilíndrica, de modo a ser orientado corretamente pelos tubos. Quando o fluxo atinge o local de incidência do laser o espermatozoide deve estar com a cabeça voltada para baixo, com a parte chata de frente para o detector a 0° e a lateral voltada para o detector a 90° . O fluxo é então quebrado em gotas que são eletricamente carregadas de acordo com a classificação X ou Y. Elas caem através de um campo elétrico e sua deslocação ocorre devido a atração de cargas opostas, separando o sêmen em dois fluxos distintos. (b) O detector a 90° percebe a distribuição de fluorescência e calcula o percentual de espermatozoides orientados corretamente, representando-o em um gráfico. No exemplo estão destacados os gametas com posicionamento correto (70%). (c) mostra o gráfico gerado pelo detector a 0° que ilustra a separação da população X e Y dos gametas corretamente orientados mostrados em (b). As linhas verticais nos picos delimitam uma área central em que o esperma não pode ser corretamente separado, havendo mistura de X e Y e por essa razão são descartados, ou seja, não recebem carga e acabam formando um fluxo vertical que será rejeitado.

Fonte: Johnson (2000)

O cromossomo X dos mamíferos contém mais DNA do que o Y, e a medição precisa dessa diferença é a base para a separação seminal por citometria (JOHNSON, 2000; MAXWELL *et al.*, 2004). Estudos anteriores revelam que quanto maior essa diferença entre cromossomos, mais eficiente será a resolução entre as populações espermáticas de X e Y (BEHR *et al.*, 2009a; MAXWELL *et al.*, 2004). A diferença entre o conteúdo de DNA do cromossomo X e Y dos animais domésticos e selvagens, medido por citometria de fluxo, revela grandes variações. Cada espécie apresenta uma taxa de desigualdade espermática específica (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Mais de 40 mamíferos tiveram esse parâmetro determinado até o momento pela citometria de fluxo. Destes o que mostrou maior diferença foi o Chinchila, com 7,5% e o que apresentou menor variação entre material genético foi o Gambá, 2,3% (BEHR *et al.*, 2009a; GAO *et al.*, 2009; GARNER, 2006; MAXWELL *et al.*, 2004; O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009).

A diversidade está associada com a relação entre conteúdo total de DNA e o tamanho dos cromossomos sexuais, bem como é influenciado pelo número de cromossomos, tamanho e morfologia dos mesmos. O elefante-asiático (*Elephas maximus*) possui um cromossomo Y maior quando comparado com o elefante-africano (*Loxodonta africana*) (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009), isso representa uma diferença entre X e Y maior no segundo caso, 3,3% contra 4,0%, respectivamente (BEHR *et al.*, 2009a).

3.3.2 Adaptações feitas no citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo celular tem que ser modificado para possibilitar seu uso na sexagem de espermatozoides. O modelo celular é normalmente configurado com um detector de fluorescência perpendicular a faixa de laser (90°). A modificação para a técnica reprodutiva consiste em um detector adicional diretamente a frente do feixe de luz. Essa alteração permite a coleta da luminescência de ambas as faces da cabeça espermática: a lateral (90°) e a parte dianteira achatada (0°). Entretanto, somente os espermatozoides corretamente orientados são analisados (JOHNSON, 2000; KEHUAN LU, YANGQING LU, 2013).

Existem diversas mudanças no maquinário que permitem melhorias significativas nas leituras. Dentre elas a substituição dos sistemas de agulhas padrão dos citômetros por bocais especialmente projetados, foi notoriamente importante. Essa modificação aumentou o percentual de espermatozoides devidamente orientados, de 25% para 70%, melhorando a eficiência geral da separação de duas a dez vezes. Separar espermatozoides baseados no

conteúdo de DNA é difícil quando comparado a outros tipos celulares. A compactação excessiva da cromatina e as cabeças morfológicamente achatadas, causa alto índice de refração. A diferença dos índices do espermatozoide e do meio circundante, associado com o formato chato da parte dianteira do gameta, resulta em uma emissão de sinal luminoso principalmente a partir da lateral da cabeça. Essas propriedades esclarecem o papel crítico da orientação do espermatozoide para a sua correta leitura e a razão para tamanho aumento na eficiência devido a uma melhora na orientação (JOHNSON, 2000).

Outra adaptação que elevou a rapidez do processo é a utilização de dois bocais capazes de operar paralelamente, encontrados nos equipamentos mais modernos. Essa modificação foi desenvolvida para remediar uma limitação primordial dessa tecnologia: cada espermatozoide deve ser validado e separado individualmente, conforme o fluxo deixa o bocal. Outras configurações com maior número dessas peças têm sido testadas, entretanto nenhuma dessas conformações mais complexas é usada comercialmente (SEIDEL, 2014).

3.3.3 Histórico

Esse método, combinado à posterior inseminação artificial (IA) ou FIV/TE, é o mais efetivo para alcançar a pré-seleção do sexo da progênie. Uma vez que a produção de embriões em laboratório, seguida de sua sexagem pode ser feita até certo limite, pois o desperdício dos embriões do sexo indesejado limita seu uso, por torna-la ineficiente. (JOHNSON, 2000; MAXWELL *et al.*, 2004).

O nascimento de filhotes com sexo predeterminado usando espermatozoides separados por citometria de fluxo foi realizado pela primeira vez em coelhos há 25 anos atrás (JOHNSON; FLOOK; HAWK, 1989). Desde então, progênies foram produzidas usando essa técnica associada com diversas ART para os diferentes animais: suíno (JOHNSON *et al.*, 2005), bovino (MOROTTI *et al.*, 2014; UNDERWOOD *et al.*, 2010), búfalos (GAVIRAGHI *et al.*, 2013; KEHUAN LU, YANGQING LU, 2013), cavalo (LINDSEY; BRUEMMER; SQUIRES, 2001; LINDSEY *et al.*, 2010), ovino (DE GRAAF *et al.*, 2007a, 2007b; HOLLINSHEAD *et al.*, 2002), gatos (POPE *et al.*, 2009), cães (MEYERS *et al.*, 2008) e inclusive alguns animais não domésticos como veados (GAO *et al.*, 2009) e golfinhos (O'BRIEN; ROBECK, 2006).

A patente da sexagem de gametas por citometria foi submetida em 1991, no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com Dr. Lawrence Johnson como seu

inventor. Essa patente espirou, mas dezenas de outras referentes a melhorias e variações permanecem a serem preenchidas em diversos países do mundo, muitas foram licenciadas e sub-licenciadas para múltiplas entidades ao longo dos anos (SEIDEL, 2014).

O primeiro modelo de citômetro de fluxo adaptado para sexagem espermática era capaz de processar 400.000 espermatozoides por hora, o que tornava necessário 25 horas de trabalho para ter células suficientes para uma dose inseminante (10×10^6 espermatozoides) (GARNER; SEIDEL, 2008). Atualmente a rapidez de passagem circula ao redor dos 80 km/h durante o qual 1.800.000 espermatozoides podem ser avaliados em uma hora sob circunstâncias ideais, já o percentual realmente sexado depende do nível de acurácia desejado (SEIDEL, 2014).

4 EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO POR CITOMETRIA

4.1 Rapidez e eficiência

Para possibilitar o uso da técnica de sexagem de sêmen de modo rotineiro em animais silvestres é necessário que os protocolos sejam eficientes de modo a maximizar a possibilidade de gerar progênie, caso contrário o custo-benefício de se conseguir o material biológico para tal técnica torna-se pouco atrativo. A rapidez do processo está fortemente ligada ao instrumento utilizado e ao operador, além da própria amostra. Essa última pode diferir segundo a diferença de DNA, específico para cada espécie, proporção de células viáveis, ligada ao reprodutor e ao modo em que foi realizada a coleta, e orientação correta das mesmas durante a passagem pelo citômetro (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2005a).

No intuito de ilustrar a eficiência da máquina em situação padrão podemos usar uma amostra hipotética de sêmen bovino com 10% de espermatozoides com membrana comprometida, utilizando-se uma acurácia de 90%, 32.000 células podem ser avaliadas por segundo, dos quais 3.000 são descartadas como mortas ou morrendo; 8.000 não são avaliadas devido a mal posicionamento; outros 4.000 não podem ser distinguidos claramente entre X e Y por variabilidade biológica ou de procedimento; 1.000 são rejeitados devido a problemas técnicos como dois espermatozoides em uma mesma gota ou por estarem muito perto um do outro no fluxo para conseguir uma informação acurada; Alguns ainda são perdidos no espaço morto do equipamento ou usados para controle de qualidade; Portanto somente 16.000 gametas foram realmente medidos por segundo, ou 8.000 de cada sexo, o que representa 25% do ejaculado para cada categoria. Infelizmente as dificuldades não terminam aqui porque espermatozoides separados são muito diluídos e devem ser concentrados por processo de centrifugação antes do seu uso, uma nova percentagem das células já separadas é, então, mais uma vez perdida durante o processo (SEIDEL, 2014).

Apesar de representar perdas o processo de sexagem possui o benefício adicional de descartar espermatozoides inviáveis, representados por mortos ou morrendo e os com membrana comprometida. Entretanto, como visto anteriormente, a capacidade do citômetro é desperdiçada avaliando esses gametas, podendo aumentar o tempo necessário para atingir o número de células almejadas (SEIDEL, 2014).

Outro aspecto a ser considerado é que os valores acima citados são padrões para sêmen bovino, um dos mais fáceis de sexar. Animais selvagens podem mostrar valores

diferentes. Estudos mostram que em Cervo japonês (*Cervus nippon*) as perdas podem chegar a 80% do total de espermatozoides durante os vários processos de separação, centrifugação e empacotamento do sêmen (GAO *et al.*, 2010).

Devido às perdas acima mencionadas o uso de um citômetro de fluxo é essencial para a pesquisa de otimização de protocolos de sexagem seminal e de conservação do material sexado. Uma vez que se criou um procedimento padrão para a espécie, o próximo passo seria utiliza-lo a fim de separar as populações espermáticas para o uso em IA. Nesse caso um único citômetro, mesmo que operando por 24 horas, pode não ser suficiente para formar uma dose inseminante. Para animais com grande número de espermatozoides por ejaculados, como é o caso de elefantes, rinocerontes e golfinhos, por exemplo, o emprego de um único aparelho significa que a amostra não poderá ser processada nas primeiras 24 horas de armazenamento, momento em que a sua qualidade é máxima. Deve-se levar em conta que antes e depois do procedimento é necessário tempo de deslocamento da amostra do local onde se encontra o animal até o laboratório e vice e versa, prejudicando, ainda mais, a qualidade do sêmen. Um laboratório que dispõe de mais de um citômetro permite minimizar o tempo do processo, onde a amostra sexada é ampliada, permitindo a produção de uma dose para IA e a eficiência do uso do ejaculado é maximizada(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009).

4.2 Posição correta da célula na leitura

Somada a diferença de DNA entre os cromossomos, a habilidade de orientar os espermatozoides corretamente no momento da leitura do citômetro afeta fortemente a eficiência do processo. A disposição depende grandemente da morfologia e do tamanho das cabeças. As achatadas e ovaladas se prestam mais prontamente a orientação necessária devido à hidrodinâmica do aparelho, quando comparados às células que possuem a parte anterior mais arredondada ou angular (GARNER, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2005b), como é o caso do gato doméstico, que devido a uma parte anterior do gameta arredondada, tem a tendência de não se orientar prontamente (SPINACI *et al.*, 2007). A influência do tamanho pode ser vista mais claramente no cão. Essa espécie tem uma diferença de DNA cromossômica similar ao bovino (2,9% e 3,8% respectivamente) e ambos possuem gametas com cabeças achatadas e ovaladas. Entretanto, o tamanho destas diverge, enquanto o bovino tem uma área de $34,5 \mu\text{m}^2$, o cão possui $20,9 \mu\text{m}^2$. Esses parâmetros são suficientes para tornar o canino 1,6 veze mais difícil de sexar do que o bovino (OI *et al.*, 2013).

Essa hipótese sugere que gametas aneuplóides com cabeças microcefálicas e macrocefálicas terão orientação errônea, levando a uma fluorescência anormal, e por essa razão são removidos das populações sexadas. Assim as populações de X e Y seriam compostas de espermatozoides morfologicamente normais (O'BRIEN *et al.*, 2005b). A separação de formas patológicas pode ser vista especialmente em caninos, em estudos recentes de OI *et al.* (2013) foram visualizadas 0,13% de espermatozoides diploides antes da sexagem, já após o processamento a alteração não foi encontrada.

Apesar dessa vantagem adicional, no caso de alpacas, dado a elevada proporção de esperma com alterações morfológicas, a remoção dos gametas com morfologia deficiente pode se mostrar beneficiária para reduzir o tempo de separação e aumentar a eficiência do processo (MORTON *et al.*, 2008). Gorilas costumam sofrer do mesmo mal, O'Brien *et al.* (2005) adotaram o procedimento de centrifugação de gradiente de densidade na amostra anteriormente a sexagem, com intuito de melhorar a qualidade e resolução do ejaculado.

4.3 Utilização do corante

Somada as diferenças já citadas entre espécies, os animais ainda diferem no grau com o qual os espermatozoides vivos podem ser corados com Hoechst 33342. A diferença de absorção é pequena, contudo somente com a mais alta resolução de conteúdo genético pode-se obter a otimização do processo para cada espécie ou até mesmo para cada reprodutor individualmente (HOLLINSHEAD *et al.*, 2004). É possível ver as vantagens da adaptação da técnica para cada animal marcadamente no caso do gato doméstico. Essa espécie tem a capacidade de ser separado com uma baixa concentração de H33342, o que permite reduzir-se o risco de toxicidade por efeito do corante (POPE *et al.*, 2009).

4.4 Índice de separação espermática

O índice de separação espermático (SSI) relaciona diversos parâmetros de grande influencia na sexagem, oferece um indício apropriado da capacidade de um sêmen de ser separado. No índice a diferença de DNA relativa entre o cromossomo X e Y, em percentual, e a área do perfil de cabeça, em μm^2 , são multiplicados. Essa abordagem sugere que o touro seria o animal mais fácil de separar devido a uma área de cabeça de $34.5 \mu\text{m}^2$ e diferença de 3,8% resultando em um índice de 131. Por outro lado a espécie mais difícil de obter populações distintas seria a humana, com uma cabeça de $10,8 \mu\text{m}^2$ e uma diferença de 2,8%,

originando um valor de 31(GARNER, 2006). Os índices dos animais de produção e domésticos, contudo, permanecem em uma faixa entre 59, do garanhão, e 131 (GARNER, 2006; O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009).

Os animais selvagens, todavia, apresentam maior diversidade entre si do que as espécies domesticadas. O elefante-africano (*Loxodonta africana*), por exemplo, se assemelha ao cão (82) e gato (80) com um valor de 76, já o elefante-asiático (*Elephas maximus*) (66) mostra valores mais similares ao garanhão. Rinocerontes, por outro lado, apresentam-se entre os valores do garanhão e do homem (31) (GARNER, 2006), sendo o branco (*Ceratotherium simum simum*) 47, a espécie preta (*Diceros bicornis*) 48 e o indiano (*Rhinoceros unicornis*) 51 (BEHR *et al.*, 2009a).

5 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLOS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS

A fisiologia espermática varia grandemente nos diversos animais e por isso é considerado espécie-específica. Frequentemente o conhecimento sobre tal área é limitado ou ausente nas espécies de vida selvagem. Essa realidade ressalta a necessidade de se desenvolver novos protocolos para o manuseio do sêmen antes, durante e posterior a sexagem do mesmo, englobando a coloração, separação e preservação deste (MAXWELL *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 2005a). Pesquisas devem ser realizadas individualmente para cada espécie, no intuito de se descobrir o melhor método de reprodução assistida para o animal em questão (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Estudos realizados foram sintetizados nas tabelas de 1 a 8.

Tabela 1: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Perissodactyla

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Rinoceronte Branco (<i>Ceratotherium simum simum</i>)	3,7±0,05%	47	-	-	-	An	(BEHR <i>et al.</i> , 2009a)
Rinoceronte Preto (<i>Diceros bicornis</i>)	3,7±0,03%	48	-	-	-	An	(BEHR <i>et al.</i> , 2009a)
Rinoceronte Indiano (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	3,9±0,04%	51	-	-	-	An	(BEHR <i>et al.</i> , 2009a)
Cavalo (<i>Equus caballus</i>)	-	-	+	-	+	De	(LINDSEY; BRUEMMER; SQUIRES, 2001)
	-	-	+	-	+	-	(LINDSEY <i>et al.</i> , 2010)
	3,7%	59	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Zebra (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	3,7%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 2: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Proboscidea

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Elefante Asiático (<i>Elephas maximus</i>)	3,3±0,05%	66	-	-	-	-	(BEHR <i>et al.</i> , 2009a)
Elefante Africano (<i>Loxodonta africana</i>)	3,4%	-	-	-	-	-	(JOHNSON, 2000)
	4,0%	76	-	-	-	-	(BEHR <i>et al.</i> , 2009a)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 3: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Artiodactyla

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Ovino (<i>Ovis aries</i>)	-	-	+	ET	+	De	(DE GRAAF <i>et al.</i> , 2007b)
	-	-	-	FIV/ET	+	An/De	(HOLLINSHEAD <i>et al.</i> , 2004)
	-	-	+	-	+	An/De	(DE GRAAF <i>et al.</i> , 2007a)
Bovino (<i>Bos indicus</i>)	4,2%	112	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
	-	-	-	FIV/ET	+	An	(MOROTTI <i>et al.</i> , 2014)
Bovino (<i>Bos Taurus</i>)	-	-	+	-	+	-	(FRIJTERS <i>et al.</i> , 2009)
	-	-	-	FIV/ET	+	An	(MOROTTI <i>et al.</i> , 2014)
	3,8%	131	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Bubalino (<i>Bubalus bubalis</i>)	-	-	+	-	+	De	(UNDERWOOD <i>et al.</i> , 2010)
	3,6%	-	+	FIV/ET	+	Em	(GAVIRAGHI <i>et al.</i> , 2013)
	-	-	+	-	+	-	(KEHUAN LU, YANGQING LU, 2013)
Bisão-americano (<i>Bos bison</i>)	3,6%	-	-	-	-	-	(LU <i>et al.</i> , 2010)
	-	-	-	-	-	-	(GARNER; SEIDEL, 2003)
Iaque (<i>Bos mutus grunniens</i>)	3,6%	-	-	-	-	-	(GARNER; SEIDEL, 2003)
Cervo Sika (<i>Cervus nippon</i>)	-	-	-	-	+	De	(GAO <i>et al.</i> , 2010)
	3,8%	120	+	-	+	De	(GAO <i>et al.</i> , 2009)
Cervo Wapiti (<i>Cervus elaphus</i>)	-	-	+	-	+	-	(GAO <i>et al.</i> , 2010)
Cervo Reevesi (<i>Muntiacus reevesi</i>)	6,3%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Veado-da-cauda-branca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	-	-	-	-	-	An/De	(KJELLAND <i>et al.</i> , 2011)
	4,4%	-	-	-	-	-	(DEYOUNG <i>et al.</i> , 2004)
Veado-vermelho (<i>Cervus elaphus nelsoni</i>)	3,8%	-	-	-	-	-	(JOHNSON, 2000)

(continua)

(conclusão)

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Gazela-dorcas (<i>Gazella dorcas</i>)	4,3%	-	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	3,8±0,06 %	-	-	-	-	-	(MORTON <i>et al.</i> , 2008)
Dromedario (<i>Camelus dromedarius</i>)	3,3%	-	-	-	-	-	(JOHNSON, 2000)
Girafa (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	4,4%	-	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Hipopotamo (<i>Hippopotamus amphibius</i>)	3,7%	-	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Porco (<i>Suis scrofa</i>)	3,6%	115	-	-	-	-	(GARNER, 2006)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 4: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Primata

	Diferença X e Y	IS S	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Orangotango (<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>)	3,2%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Lowland Gorila (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	2,7-2,8%	-	-	-	-	An	(O'BRIEN <i>et al.</i> , 2005b)
sagui-de-tufos-brancos (<i>Callithrix jacchus</i>)	4,09±0,03%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN <i>et al.</i> , 2005a)
Lemuri-de-caudanelada (<i>Lemur catta</i>)	4,3%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Macaco Resu (<i>Macaca mulata</i>)	4,3%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Babuino sagrado (<i>Papio hamadrya</i>)	4,2±0,03%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN <i>et al.</i> , 2005a)
Chimpanze (<i>Pan troglodytes</i>)	3,3±0,01%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN <i>et al.</i> , 2005a)
Chimpanze-pigmeu (<i>Pan paniscus</i>)	3,1%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Humano	2,97±0,05% 2,8%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN <i>et al.</i> , 2005a) (GARNER, 2006)

Tabela 4: Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 5: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Carnivora

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Gato (<i>Felis catus</i>)	-	-	-	FIV/ET	+	-	(POPE <i>et al.</i> , 2009)
	-	-	-	FIV	-	-	(SPINACI <i>et al.</i> , 2007)
	4,2%	80	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Cão (<i>Canis lupis familiaris</i>)	3,9%	82	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
	3,7%	-	+	-	+	-	(MEYERS <i>et al.</i> , 2008)
Tigre (<i>Panthera tigris tigris</i>)	4,1%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 6: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Cetacea

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Golfinho- Roaz (<i>Tursiops truncatus</i>)	4,1%	-	-	-	-	-	(GARNER; SEIDEL, 2003)
	-	-	+	-	+	An	(O'BRIEN; ROBECK, 2006)
	-	-	+	-	+	An/De	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Golfinho-de-laterais-brancas-do-pacifico (<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>)	4,1%	-	-	-	-	-	(GARNER; SEIDEL, 2003)
Beluga (<i>Delphinaterus leucas</i>)	4,0%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
Baleia assassina (<i>Orcinus orca</i>)	4,0%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 7: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Rodentia

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Coelho	3,0%	84	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
(<i>Oryctolagus Cuniculas</i>)	3,0%	-	+	FIV	+	-	(JOHNSON; FLOOK; HAWK, 1989)
Rato (<i>Mus musculus</i>)	3,6%	-	-	-	-	-	(GARNER, 2006)
Chinchila (<i>Chinchilla Lagidium</i>)	7,5%	-	-	-	-	-	(JOHNSON, 2000)
Rato-das-planices (<i>Pseudomys australis</i>)	4,2%	-	-	-	-	-	(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009)
(<i>Microtus oregoni</i>)	9,1; 12,5%	-	-	-	-	-	(GARNER; SEIDEL, 2003)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Tabela 8: Estudos realizados sobre sêmen sexado na ordem Diprotodontia

	Diferença X e Y	ISS	IA	FIV/ET ICSI	Prole	Cong	Estudo
Cusu-de-orelhas- grandes (<i>Trichosurus vulpecula</i>)	2,3%	-	-	-	-	-	(JOHNSON, 2000)

Diferença X e Y: diferença de DNA entre cromossomo X e Y. ISS: Índice de separação seminal. IA: inseminação artificial. FIV: Fertilização *in vitro*. ET: Transferência embrionária. ICSI: Injeção citoplasmática de espermatozoide. Cong: Congelado. An: Antes da sexagem. De: Depois da sexagem. An/De: antes e depois da sexagem+: foi realizado. -: não foi realizado.

Fonte: A própria Autora

Uma dos maiores contratempos na implementação de ART para maximizar a eficiência reprodutiva nos animais selvagens, tanto *in situ* quanto *ex situ*, é a dificuldade de se obter material biológico necessário para um melhor entendimento dos padrões espécie-específicos (ANDRABI; MAXWELL, 2007). O sêmen dos animais selvagens não só é de difícil acesso de modo rotineiro, mas também têm quantidade e qualidade escassos(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). As características podem variar, inclusive em diferentes partidas de um mesmo macho, e têm grande importância sobre a capacidade de sexagem do ejaculado (BEHR *et al.*, 2009a; ZHANG; LU; SEIDEL, 2003). Esses parâmetros influenciam, também, o tipo de tecnologia auxiliar a ser utilizada juntamente com a sexagem, seja ela IA ou produção de embriões *in vitro* seguida de transferência. Assim, esses problemas tornam a otimização do processo um desafio(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009).

Um exemplo claro de dificuldade de processamento por características particulares pode ser visto naqueles animais com alta viscosidade no ejaculado, como rinocerontes (BEHR *et al.*, 2009a, 2009b) e camelídeos (MORTON *et al.*, 2008). Esse padrão fisiológico interfere com a necessidade de estabilizar um único gameta em suspensão para uma orientação adequada a separação (BEHR *et al.*, 2009b).

Outra razão capaz de favorecer a ideia de pesquisas individuais é que os espermatozoides sexados são expostos a diversos fatores estressantes, dentre eles: coloração do núcleo, alta diluição, alta pressão, mudanças na composição de meio, exposição á luz de laser e centrifugação (GARNER, 2006; MAXWELL *et al.*, 2004; O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Esses processos são responsáveis por diminuições consideráveis na qualidade dos gametas, os quais, em muitos casos, já não possuem condições ideais originalmente devido a limitações das formas de coleta(O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Isso faz com que adaptações nos protocolos padrões sejam necessárias para minimizar

esse prejuízo, tornando-os não só espécie-específicos, como também individuais para cada reprodutor (GARNER, 2006; MAXWELL *et al.*, 2004). A análise das diversas etapas do processo para cada uma das espécies é crucial para evitar esse estresse desnecessário. No caso do elefante asiático, por exemplo, quando o plasma seminal é separado após a coleta a motilidade pós-congelamento melhora. Essa manipulação, todavia, não tem efeito positivo sobre a sexagem. Esse conhecimento permite evitar etapas e prevenir o estresse dessa etapa para elefantes (HERMES *et al.*, 2009).

5.1 Desenvolvimento de novos protocolos

O primeiro passo para o desenvolvimento de um protocolo de sexagem seminal para uma nova espécie é determinar a diferença existente entre a quantidade de DNA dos cromossomos X e Y. (diferença de X e Y) Esse conhecimento permite uma indicação da facilidade com que se poderá separar os espermatozoides portadores dos diferentes cromossomos sexuais em populações distintas (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009).

Sucessivamente núcleos espermáticos ou espermatozoides vivos são separados em amostras X e Y enriquecidas para estabelecer outros parâmetros básicos para a citometria de fluxo apropriados para a espécie em questão, tais como concentração mínima efetiva de corante para taxa de separação máxima, e para avaliar a precisão da técnica (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Este último relata a pureza da amostra. Animais com diferença genética maior que 3,0% são comumente analisados com a citometria de fluxo pelo chamado “*sort re-analysis*”. Nesse procedimento, uma amostra já separada é submetida a uma vibração ultrassônica para remover a parte flagelada do espermatozoide, com o intuito de melhorar a sua orientação. Essas células são, então, coradas uma segunda vez e reanalisadas pelo citômetro (WELCH; JOHNSON, 1999). A proporção das populações sucessivamente é analisada por um modelo matemático, esse produz um histograma que está equipado com uma curva Gaussiana dupla, para determinar a proporção de X e Y (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2012). O resultado pode ser validado também, por análise de unidade espermática através de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou por reação em cadeia da polimerase (PCR), essas últimas opções são as mais indicadas para diferenças menores de 3,0% (OI *et al.*, 2013; WELCH; JOHNSON, 1999).

Dentre as espécies estudadas até o momento um dos maiores desafios de pureza está associado ao Gorila. Seu ejaculado contém baixos números de espermatozoides viáveis e a

separação entre populações não foi possível em diversas amostras. O gameta masculino humano presta-se bastante bem como modelo experimental devido a sua abundante disponibilidade e morfologia similar. Utilizando-se de protocolos desenvolvidos para permitir uma alta pureza em humanos separou-se sêmen fresco e congelado de gorila. A pureza foi confirmada em 83,7 – 89,7% utilizando PCR devido a pequena diferença de DNA (2,7 – 2,8%). Embora a amostra tenha uma boa pureza, a baixa eficiência do processo e limitada viabilidade do espermatozoide separado faz com que ainda se tenham muitos desafios para obter a progênie (O'BRIEN *et al.*, 2005b).

6 REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO DO SÊMEN SEXADO

Existe, ainda, uma limitação prática para a aplicação da tecnologia de sexagem: a maioria dos laboratórios de processamento de sêmen encontra-se afastados dos locais que abrigam os machos. A fim de minimizar os danos causados pelo tempo transcorrido em deslocamento do local de coleta até o laboratório de sexagem existem diversas estratégias de conservação da amostra. Dentre as mais comuns estão o resfriamento e a criopreservação antes ou após a sexagem, pois permite que um decorrer de tempo maior com menor deterioração espermática (DE GRAAF *et al.*, 2007a; MAXWELL *et al.*, 2004; O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Essa abordagem oferece um grande potencial para a vida selvagem, uma vez que tornaria possível a armazenagem dos ejaculados em qualquer local no mundo, seu transporte para o laboratório e o processamento do mesmo quando necessário (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). Um exemplo prático dessa aplicabilidade foi realizado em um estudo dirigido no gato doméstico. Demonstrou-se que a viabilidade e fertilidade do sêmen permaneceram inalterados após a expedição, durante a noite, para se atingir o laboratório de sexagem, seguido de separação das populações e nova remessa noturna de retorno, para então ser utilizado em procedimentos de FIV. O estudo tem relevância, principalmente, para a aplicação em felídeos não domésticos (POPE *et al.*, 2009).

O primeiro nascimento de progênie derivada de sêmen congelado, sexado e recongelado foi realizado em ovelhas através do uso de FIV (HOLLINSHEAD *et al.*, 2004) e posteriormente IA (DE GRAAF *et al.*, 2007a). Outra espécie com descendência comprovada utilizando esse processo é o golfinho-roaz (*Tursiops truncatus*), segundo O'Brien *et al* (2009) gerou-se um filhote de sexo predeterminado em 2006 após inseminação endoscópica. A metodologia foi desenvolvida, também, para diversas espécies de primatas, que, contudo, não geraram prole até o momento (O'BRIEN *et al.*, 2005a, 2005b).

O final do processo de sexagem requer uma centrifugação a fim de se concentrar os gametas. A etapa não pode ser dispensada quando se visa o congelamento, os espermatozoides devem ser primeiramente concentrados para somente depois serem rediluídos e seguirem para congelamento. Com exceção desse procedimento particular, a maioria dos estudiosos tem adotado protocolos de congelamento padrão para criopreservar espermatozoides sexados (MAXWELL *et al.*, 2004). É importante salientar que, por causa do estresse mecânico e subsequente dano sofrido durante congelamento e descongelamento, o percentual de células corretamente coradas e adequadamente orientadas no citômetro é menor nas amostras criopreservadas quando comparadas à amostras frescas (BEHR *et al.*, 2009a).

Altas concentrações de gema de ovo e crioprotetores interferem na uniformidade da coloração e contribuem para uma pior orientação e menor resolução de populações de X e Y, e são responsáveis por taxas inferiores de sexagem (DE GRAAF *et al.*, 2007a; HOLLINSHEAD *et al.*, 2004). A preparação com gradiente de densidade tem papel importante na remoção de gametas não viáveis e mortos e para retirar grande parte da gema de ovo e glicerol (HOLLINSHEAD *et al.*, 2004).

Conseqüentemente, essa abordagem apresenta uma eficiência reduzida (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009). No estudo de O'Brien *et al.* (2009) o autor disponibiliza dados não publicados de golfinhos, que exemplifica esse declínio da eficácia. Para esses mamíferos aquáticos, o congelamento, sexagem e recongelamento resultam em uma população com somente 5% das células originais do ejaculado. Por essa razão, para algumas espécies esses protocolos poderão ser adotados somente quando a amostra for utilizada em FIV ou ICSI (O'BRIEN *et al.*, 2005b).

Contudo, de Gaaf (2007a) relata que obteve uma taxa de prenhes em ovelhas similar entre o sêmen congelado, sexado e recongelado, quando comparado com sêmen sexado e depois congelado ou com o controle. Alguns resultados sugerem que a população espermática após dois congelamentos e uma separação é capaz de manter a funcionalidade e a habilidade de fertilizar. Existem evidências de que esses gametas geram embriões capazes de seguir desenvolvimento normal no útero. Outros estudos têm resultados similares, comprovando que o desenvolvimento de blastocisto ovino de sete dias tiveram alta clivagem quando fecundados pelo sêmen tratado. Esses resultados sugerem que a coloração, separação, congelamento e recongelamento não parecem causar dano no DNA a ponto de influenciar sobrevivência embrionária nessa espécie (HOLLINSHEAD *et al.*, 2004).

7 FERTILIDADE E TAXA DE PREENHEZ DE SÊMEN SEXADO

Diversos estudos têm sido realizados visando melhorar a taxa de prenhez do sêmen sexado e podem ser classificados em três áreas de pesquisa principais: aumentar o número de espermatozoides sexados com precisão por unidade de tempo, tornar o processo de separação menos danoso e aprimorar o modo como a tecnologia é aplicada, como determinar a menor quantidade de células por dose inseminante e o local em que devem ser implantadas (SEIDEL, 2009).

A utilização do sêmen sexado tem mostrado menores taxas de natalidade em diversos estudos quando comparado com sêmen não separado (GAO *et al.*, 2009; KEHUAN LU, YANGQING LU, 2013; SEIDEL, 2012). Existem algumas teorias que tentam explicar essa diferença. Dentre as razões possíveis estão o menor número de espermatozoides por dose inseminante e o dano sofrido pelo gameta no processo de separação (LU *et al.*, 2010; SEIDEL, 2014). Calcula-se que 2/3 do decréscimo seja devido a menor número de gametas, ou seja, falhas no protocolo aplicado, e o restante por danos causados pelo processo de sexagem (FRIJTERS *et al.*, 2009).

Uma das principais preocupações é que o processo de sexagem seja responsável por degenerar o DNA espermático e, portanto, aumentar a incidência de anormalidades na prole (GAO *et al.*, 2009; GARNER; SEIDEL, 2008). Contraditoriamente, estudos em veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) mostram que a separação não só diminui a quantidade de espermatozoides com fragmentação de DNA, mas também melhora a longevidade do conteúdo genético devido a uma maior estabilidade do mesmo (KJELLAND *et al.*, 2011). Além disso, progênie nascida a partir da utilização de sêmen sexado parecem normais fenotipicamente, mas ainda assim são necessários estudos epidemiológicos para verificar a validade dessas observações (GAO *et al.*, 2009). Diferentemente, o desenvolvimento dos embriões gerados com o sêmen separado por citometria de fluxo parece divergir segundo a espécie. Enquanto Pope *et al* (2009) não encontraram diferença no desenvolvimento dos embriões de gatos, e de Graaf (2007b) demonstrou que em ovinos a citometria de fluxo não comprometeu a capacidade do sêmen de fertilização, nem o desenvolvimento embrionário, estudos feitos em búfalos, por outro lado, mostram uma taxa de clivagem de blastocistos desenvolvidos 10% inferior quando fertilizado por gametas sexados (KEHUAN LU, YANGQING LU, 2013).

7.1 Dano espermático gerado durante a sexagem

A natureza do dano sofrido pelo espermatozoide devido ao processo de sexagem ainda não foi bem explicada pela pesquisa, existem, entretanto, varias possibilidades, incluindo a distensão da cauda dos espermatozoides durante a formação das gotas pelo vibrador, permanência da ligação do Hoechst 33342 no DNA espermático pós-fertilização, retardando o progresso da primeira célula entre fertilização e a primeira clivagem, entre outros. (SEIDEL, 2012). No intuito de minimizar esses danos uma temperatura constante, osmolaridade do buffer, pH e a utilização de corante, invólucro e do meio de criopreservação estéreis são imprescindíveis (MAXWELL *et al.*, 2004).

Observou-se uma menor motilidade do gameta sexado, mais especificamente um movimento de calda mais rígido(SUH; SCHENK; SEIDEL, 2005). A diminuição de movimento pode ser exacerbada durante a fase de motilidade hiperativa do espermatozoide, que ocorre logo antes da penetração da zona pelúcida, gerando uma fecundação retardada e envelhecimento do gameta feminino(SEIDEL, 2012).

Uma possível explicação para a origem da rigidez do movimento flagelar do espermatozoide sexado seria a alta pressão usada no procedimento (FRIJTERS *et al.*, 2009). O tamanho e o número de gotas por unidade de tempo dependem de diversas variáveis, tais como formato do orifício e diâmetro, características físicas do fluido, pressão do sistema, temperatura, etc. Na verdade estas características determinam se haverá a formação de uma gota ou se o fluido irá correr com um fluxo contínuo. Essa alta pressão gera sequelas e essas podem comprometer a viabilidade e motilidade do espermatozoide, reduzindo, assim, a fertilidade. Foi sugerido que a diminuição da pressão pode não diminuir o dano de modo linear. Estudos sugerem que uma diminuição de da pressão para $2,8 \text{ Kg/cm}^2$ pode melhorar visivelmente a qualidade espermática sem diminuição significativa na performance do citômetro (SUH; SCHENK; SEIDEL, 2005).

Outra possível explicação para a baixa fertilidade é o grande número de moléculas de Hoechst 33342 ligadas fortemente ao material genético do espermatozoide. A alta afinidade desse corante por DNA e RNA pode ser capaz de retardar mudanças químicas complexas, como descondensação da cromatina e duplicação do DNA (SEIDEL, 2012). Existem, ainda, indicações que o uso do H33342 somado a exposição ao laser durante o processo de sexagem tenda a aumentar o índice de aberrações cromossômicas (GARNER, 2006), no estudo de Gao *et al* (2010) a progênie gerada com sêmen separado, exposto a ambos os fatores, nasceu normal e não foram observadas alterações nas gestações ou abortos.

7.2 Causas de baixa fertilização não relacionadas ao processo de sexagem

Apesar das várias possibilidades de lesões não é claro se a perda de fertilidade foi devido ao dano no DNA e consequente aumento da perda embrionária precoce. Outros possíveis fatores são responsáveis, como dose inseminante, tempo de inseminação relacionada a ovulação, manipulação do trato reprodutivo feminino ou baixa viabilidade do próprio trato reprodutivo (MAXWELL *et al.*, 2004).

Uma redução de viabilidade no trato reprodutivo da fêmea pode ser a causa da reduzida taxa de fertilidade, talvez devido a um encurtamento de vida útil pós-separação do sêmen sexado, ou por uma interação alterada com o epitélio do oviduto (DE GRAAF *et al.*, 2007b; MAXWELL *et al.*, 2004). Por essa razão o aumento de precisão da inseminação relativo ao horário da ovulação tem papel crucial na obtenção de valores de fertilidade que justifiquem o uso da técnica de sexagem (DE GRAAF *et al.*, 2007a; GARNER, 2006).

7.3 Uso de outras biotecnologias reprodutivas para incrementar os índices de fertilidade

Para a obtenção de progênie com sexo predeterminado não basta separar o sêmen em populações contendo espermatozoides portadores de X ou Y, é necessário que haja fecundação, desenvolvimento embrionário e prenhez. Para tal é inevitável o uso de IA ou produção embrionária *in vitro*, seguido de transferência de embriões. Essas duas opções abrangem um conjunto de diversas técnicas.

Em uma IA em que é utilizado sêmen sexado, por exemplo, existem diversos locais do trato genital em que pode ser realizada a deposição do sêmen, em diferentes horários. Quando a IA é realizada o mais perto possível do período de ovulação e do sítio de fertilização há maior taxa de sucesso da fecundação e subsequente prenhez (MAXWELL *et al.*, 2004). Por essa razão, uma alternativa para otimização da separação seria aperfeiçoar as ferramentas de inseminação, para permitir o uso de um menor número de células separadas, como, por exemplo, a deposição de material nas porções superiores dos cornos uterinos (GARNER, 2006). A inseminação ovidutal é um método que vem sendo usado em equinos para se alcançar número de gestações aceitáveis, utilizando-se de uma quantidade reduzida de espermatozoides (LINDSEY; BRUEMMER; SQUIRES, 2001)

Outra opção, ainda mais eficiente, para espécies com baixo número de espermatozoides por ejaculado, como é o caso de primatas e felídeos, seria a associação com técnicas de produção de embriões *in vitro*, como FIV e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide), e posterior transferência de embriões (ANDRABI; MAXWELL, 2007; HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007).

Apesar de que em animais com baixo número de espermatozoides por ejaculado seja possível obter-se uma quantidade adequada de espermatozoides para os procedimentos *in vitro* ao longo de várias horas, essa abordagem se baseia na habilidade de se coletar oócitos e no fato de se ter um protocolo otimizado para a produção de embriões.

No caso do gorila, por exemplo, a tecnologia de sexagem foi desenvolvida, entretanto, ainda não se tornou viável a produção de progênie devido a diversos fatores, a começar pela baixa quantidade de espermatozoides obtidos por ejaculado, limitando seu uso para técnicas como FIV ou ICSI. Somado a esse fato, existe uma limitada disponibilidade de doadoras do oócitos, impossibilitando o desenvolvimento de um procedimento adequado para a produção de embriões. Esse é um problema comum nos animais selvagens (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009), principalmente em felídeos que, segundo evidências, podem ovular sem o estímulo da cópula (POPE; GOMEZ; DRESSER, 2006), tornando o momento ideal para coleta imprevisível. Mesmo assim pesquisas têm sido desenvolvidas superando todas as dificuldades para estabelecer parâmetros que possibilitam um fundamento para construir novas tecnologias (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2005; POPE *et al.*, 2009; SPINACI *et al.*, 2007).

8 CONCLUSÃO

Concluindo, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas extensas e espécie-específicas na reprodução de animais selvagens, pois permitirão utilizar técnicas de reprodução assistida na conservação desses animais.. A técnica de sexagem seminal oferece diversas vantagens para as ações de conservação dessas espécies, como o adequado manejo de população e a manutenção da relação entre machos e fêmeas mais próxima a encontrada na natureza.

É importante lembrar que a reprodução animal em zoológicos têm como objetivo principal o aumento do número de animais para o reestabelecimento de uma população geneticamente sustentável de uma espécie ameaçada. Esse objetivo não deve limitar-se à população de cativeiro, a reintrodução de animais selvagens em seus habitats naturais deve ser estimulada.

O nascimento de progênie sexada pode auxiliar nesse fim, pois no momento de reintrodução, a soltura de um grupo de indivíduos com a proporção dos sexos feminino e masculino similar àquela encontrada na natureza e pode maximizar sua chance de adaptação e sobrevivência. A libertação de grupos sem a relação dos sexos adequada pode resultar em abandono de indivíduos como um modo de buscar esse equilíbrio entre machos e fêmeas. No caso de reintrodução de animais isolados em populações já existentes na natureza, há uma tendência de maior aceitação de fêmeas pelos grupos locais, por esta razão esse sexo deve ser priorizado nestas ações, não somente para evitar conflitos na interação social do grupo já estabelecido, mas também para aumentar o número de reprodutoras, a fim de se estimular um aumento populacional.

REFERÊNCIA

- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 223–43, June 2007.
- BEHR, B. *et al.* Germany/Australia index of sperm sex sortability in elephants and rhinoceros. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 273–7, Apr. 2009a.
- BEHR, B. *et al.* Feasibility of sex-sorting sperm from the white and the black rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 3, p. 353–64, Aug. 2009b.
- DE GRAAF, S. P. *et al.* Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 2, p. 391–8, 15 Jan. 2007a.
- DE GRAAF, S. P. *et al.* Embryo production from superovulated sheep inseminated with sex-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 3, p. 550–5, Feb. 2007b.
- DEYOUNG, R. W. *et al.* Do *Odocoileus virginianus* males produce Y-chromosome-biased ejaculate? Implications for adaptive sex ratio theories. **Journal of Mammalogy**, Lawrencev. 85, n. 4, p. 768 – 773, Aug. 2004.
- ESPINOSA-CERVANTES, R.; CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. Sexing sperm of domestic animals. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, n. 1, p. 1–8, Dec. 2012.
- FRIJTERS, A C. J. *et al.* What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 1, p. 64–7, 1 Jan. 2009.
- GAO, Q. H. *et al.* Flow cytometric sexing of X- and Y-chromosome-bearing sperm in Sika deer (*Cervus nippon*). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 81, n. 2-3, p. 100–104, Feb. 2009.
- GAO, Q. H. *et al.* Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted Sika (*Cervus nippon*) sperm in Wapiti (*Cervus elaphus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 89–93, Mar. 2010.
- GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 5, p. 943–57, 15 Mar. 2006.
- GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. Past, present and future perspectives on sexing sperm. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.83, n. 3, p. 375 - 384, Sept. 2003.
- GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 7, p. 886–95, 15 Apr. 2008.

- GAVIRAGHI, A *et al.* Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 8, p. 1171–6, May 2013.
- HERMES, R. *et al.* Sperm sex-sorting in the Asian elephant (*Elephas maximus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3-4, p. 390–6, June 2009.
- HERMES, R.; GO, F. Assisted reproduction in female Rhinoceros and Elephants – Current Status and Future Perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 33–44, Sep. 2007.
- HOLLINSHEAD, F. K. *et al.* Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 14, n. 7-8, p. 503–508, Jan. 2002.
- HOLLINSHEAD, F. K. *et al.* Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 5, p. 557–68, May 2004.
- HOLT, W. V.; O'BRIEN, J.; ABAIGAR, T. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 19, n. 6, p. 709, May 2007.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. The IUCN red list of threatened species. Cambridge, 2014. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 12 nov. 2014
- JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 93–107, 2 July 2000.
- JOHNSON, L. A. *et al.* Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 615–24, 15 Jan. 2005.
- 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**, New York, v. 41, n. 2, p. 199–203, Aug. 1989.
- KEHUAN LU, YANGQING LU, Z. M. AND X. Y. Sperm sexing in Buffalo using flow cytometry. **Buffalo Bulletin**, Bangkok, v. 32, n. 1, p. 22–30, Nov. 2013.
- KJELLAND, M. E. *et al.* DNA fragmentation kinetics and postthaw motility of flow cytometric-sorted white-tailed deer sperm. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 3996–4006, Dec. 2011.
- LINDSEY, A C.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3-4, p. 279–89, 3 Dec. 2001.

- LINDSEY, A. C. *et al.* Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, n. 2, p. 128–132, 5 Jan. 2010.
- LU, Y. *et al.* Sex-preselected buffalo (*Bubalus bubalis*) calves derived from artificial insemination with sexed sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 3-4, p. 169–71, June 2010.
- MACHADO, G. M. *et al.* Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 8, p. 1289–97, May 2009.
- MADRID-BURY, N. *et al.* Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. **Zygote**, v. 11, n. 3, p. 229–235, Aug. 2003.
- MAXWELL, W. M. C. *et al.* Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, n. 2004, p. 79–95, July 2004.
- MEYERS, M. A. *et al.* Birth of Canine Offspring Following Insemination of a Bitch With Flow-Sorted Spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 20, n. 1, p. 213, Dec. 2008. Abstract
- MOROTTI, F. *et al.* Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 81, n. 5, p. 696–701, 15 Mar. 2014.
- MORTON, K. M. *et al.* Quantification of the DNA difference, and separation of X- and Y-bearing sperm in alpacas (*Vicugna pacos*). **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 638–42, Oct. 2008.
- O'BRIEN, J. K. *et al.* Flow cytometric sorting of non-human primate sperm nuclei. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 1, p. 246–59, 1 Jan. 2005a.
- O'BRIEN, J. K. *et al.* Flow cytometric sorting of fresh and frozen-thawed spermatozoa in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). **American Journal of Primatology**, New York, v. 66, n. 4, p. 297–315, Aug. 2005b.
- O'BRIEN, J. K.; ROBECK, T. R. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 18, n. 3, p. 319, Jan. 2006.
- O'BRIEN, J. K.; STEINMAN, K. J.; ROBECK, T. R. Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 1, p. 98–107, 1 Jan. 2009.
- OI, M. *et al.* Sexing of Dog Sperm by Fluorescence In Situ Hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 0–4, Feb. 2013.

POPE, C. E. *et al.* Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 5, p. 864–71, 15 Mar. 2009.

POPE, C. E.; GOMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, n. 6-7, p. 1518–24, Oct. 2006.

RESENDE, M. V. **Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação de gradiente de densidade contínuo de Percoll e Optiprep**. 2007. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

SANG, L. *et al.* An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 4, p. 2060–70, Apr. 2011.

SEIDEL, G. E. Sperm sexing technology-the transition to commercial application. An introduction to the symposium “update on sexing mammalian sperm”. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 1, p. 1–3, 1 Jan. 2009.

SEIDEL, G. E. Sexing mammalian sperm - Where do we go from here? **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 58, p. 505–9, Nov. 2012.

SEIDEL, G. E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal : an International Journal of Animal Bioscience**, v. 8 Suppl 1, p. 160–4, May 2014.

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

SPINACI, M. *et al.* In vitro production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 4, p. 872–7, 1 Mar. 2007.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 1035–1048, Sept. 2005.

UNDERWOOD, S. L. *et al.* Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2-4, p. 171–5, Apr. 2010.

WELCH, G.R; JOHNSON, L. A. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. **Theriogenology**, Stoneham, v.52, n.8, p. 1343-1352, Dec. 1999.

WOLF, C. A. *et al.* The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 55, n. 55, p. 110–115, Apr2008.

YANG, W.-C. *et al.* Tentative identification of sex-specific antibodies and their application for screening bovine sperm proteins for sex-specificity. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 217–23, Jan. 2014.

ZHANG, M.; LU, K. H.; SEIDEL, G. E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 9, p. 1657–1663, Dec. 2003.