



Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes

New biotech of immunosexing of ruminant's spermatozoa

Bruna Farias Brito¹, Bárbara Mara Bandeira Santos², Luiz Carlos Pinheiro Maia³, Marcos Fernando de Resende Matta⁵, José Ferreira Nunes^{1,2,3}, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{2,3,4,6, £}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Rede Nordeste de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴ACP Biotecnologia, IncubaUECE, Fortaleza, CE, Brasil.

⁵HY Biotecnologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

A sexagem espermática é uma biotecnologia que consiste na separação de espermatozoides portadores do cromossomo “X” ou “Y”. Esta técnica tem se destacado na área de produção animal, uma vez que tem despertado um grande interesse comercial, devido à possibilidade de aumentar a rentabilidade dos empreendimentos. Assim, esta revisão teve como objetivo abordar as principais técnicas utilizadas para sexagem espermática e seus avanços em relação a aplicabilidade no sistema pecuário. Todavia, diversos aspectos relacionados à técnica de sexagem de células espermáticas ainda necessitam ser elucidados, a fim de aprimorar ou desenvolver novas tecnologias que servirão para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e acessíveis aos produtores.

Palavras-chave: espermatozoide, sexagem, anticorpo.

Abstract

The sperm sexing is a biotechnology that consists of the separation of spermatozoa bearing the X or Y chromosome. This technique has been outstanding in animal production, since it has aroused a great commercial interest, due to the possibility of increasing the profitability of the enterprises. Thus, this review aimed to approach the main techniques used for sperm sexing and its advances regarding applicability in the livestock system. However, several aspects related to the sexing technique of sperm cells still need to be elucidated to improve or develop new technologies that will serve to develop more efficient and accessible methodologies for producers.

Keywords: spermatozoa, sexing, antibody.

Introdução

A sexagem espermática é uma biotecnologia que consiste na separação das duas populações de espermatozoides, os portadores do cromossomo “X” e os portadores do cromossomo “Y”. Esta é realizada por meio de diversas técnicas, com o propósito de utilizar para a fecundação somente amostras que darão origem a animais de um sexo pré-determinado, visando uma maior proporção de descendentes do sexo desejado.

Esta biotecnologia tem se destacado na medicina veterinária, principalmente na área de produção animal, uma vez que tem despertado um grande interesse comercial, devido à possibilidade de aumentar a rentabilidade de um empreendimento (Garner, 2006).

A utilização da sexagem é de grande importância para a produção de leite no âmbito comercial, pois a seleção do sexo permite uma redução do nascimento de machos, reduzindo os gastos com os mesmos e intensificando o investimento apenas em fêmeas, otimizando assim os custos na produção. Já na produção de carne, sabe-se que existem diferenças relativas às características das carcaças entre os sexos, nas quais os machos possuem maior rendimento de carcaça ao abate em comparação com as fêmeas na mesma de idade. Desta forma, seria possível em um sistema de produção direcionado ao abate, por meio da sexagem, programar o nascimento de um maior percentual de machos (Seidel, 2007).

Outro fator relevante para o controle dos sexos dos animais de produção de carne é a seleção de fêmeas para reposição de matrizes, gerando produtos que possibilitarão maior rendimento após o abate (Hohenboken, 1999).

Então, pode-se dizer que a importância dessa tecnologia é a sua utilidade para maximizar a produção animal com menor custo, ao permitir a possibilidade da produção em escala comercial de doses de sêmen com maiores percentuais de espermatozoides “X” ou “Y”. Desta maneira, há uma adição aos benefícios da utilização da

[£]Correspondência: crismelloacp@gmail.com

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 18 de janeiro de 2019



inseminação artificial (IA), conferindo-lhe papel relevante na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho (Lima, 2007).

Diante do exposto, esta revisão teve como objetivo abordar as principais técnicas utilizadas para sexagem espermática, tendo como enfoque as suas vantagens, desvantagens e seus avanços em relação a aplicabilidade no sistema pecuário.

Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação ou sedimentação de espermatozoides por gradiente de densidade permite a separação das células, através da massa relacionada a quantidade de DNA e proteína nuclear existente, sendo obtido um maior valor em espermatozoides portadores do cromossomo “X” (Windsor et al., 1993).

Lima et al. (2011) desenvolveram um processo de separação dos espermatozoides “X” de bovinos em gradientes descontínuos de densidade. Estes são compostos de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias de partículas coloidais que permitem, em uma única centrifugação, separar as impurezas (espermatozoides imaturos, células e bactérias) dos espermatozoides viáveis e, dentre estes, os espermatozoides “X” e “Y”.

Essa separação dos dois tipos de espermatozoides ocorre devido à diferença do conteúdo do DNA dos espermatozoides “X” e “Y” dos bovinos, que resulta em uma diferença de densidade, sendo possível executá-la quando se utiliza um gradiente com alta resolução de densidade como o *Percoll*[®], por exemplo (Windsor et al., 1993).

Oliveira et al. (2011), ao avaliarem a taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados, observaram que após o processo recuperam-se, em média, 5,5% dos espermatozoides descongelados submetidos ao procedimento de sexagem. Isto resultaria em aproximadamente 290 milhões de espermatozoides sexados a cada hora, utilizando-se apenas uma centrífuga com capacidade para 48 tubos, sugerindo-se que a metodologia de sexagem empregada não agride as células espermáticas de maneira significativa, por se tratar de um meio definido e de uma metodologia bastante simples. Além disso, o *Percoll*[®] possui propriedades que promovem efeitos favoráveis sobre a qualidade espermática das amostras descongeladas, pois seleciona as melhores células, com maior competência para o batimento flagelar.

Em um ensaio *in vitro*, no qual um total de 254 embriões de bovinos foi submetido à identificação genética do sexo, ao comparar os dados dos grupos de sexagem (*Percoll*[®] e *OptiPrep*[™]) com o controle, foi observado um maior percentual de fêmeas no grupo *Percoll*[®] e não no grupo *OptiPrep*[™] (Resende et al., 2009).

Em ovinos, o protocolo consiste na utilização do gradiente de *Percoll*[®], elaborado com a solução estoque de *Percoll*[®] adicionada de DMEM (pH 7.4, 280 a 290 mOsm/l), com 0,3% (peso/volume) de albumina sérica bovina (BSA), obtendo-se densidades variando de 1.110 a 1.123 g/ml. O gradiente de *OptiPrep*[™] é preparado misturando-se diferentes proporções de DMEM contendo 0,3% (peso/volume) de BSA, pH 7,4 para se obterem densidades variando de 1,110 a 1,123 g/ml. As três camadas dos gradientes de densidade contínuos de *Percoll*[®] e *OptiPrep*[™] são consecutivamente montadas em tubos de 15 ml de poliestireno e os tubos permanecem a 4 °C por 24 h para transformação do gradiente descontínuo em um gradiente contínuo de densidade. Para a centrifugação, aproximadamente 100 milhões de espermatozoides recém-colhidos (sêmen fresco) são depositados sobre cada tubo contendo os gradientes contínuos de *Percoll*[®] e *OptiPrep*[™], centrifugados a 500 x g por 15 min. a 22 °C, removidos os sobrenadantes e colhidos os espermatozoides, localizados no fundo dos tubos (Resende et al., 2015).

Resende et al. (2015), ao avaliarem o efeito da centrifugação de espermatozoides ovinos por gradiente de densidade contínuo sobre a taxa de prenhez e a proporção do sexo, em 135 ovelhas inseminadas por via laparoscópica, observaram que o processo de centrifugação em gradientes de densidade contínuos de *Percoll*[®] e *OptiPrep*[™], na espécie ovina, não interferiu na taxa de prenhez e na viabilidade espermática. No entanto, não foi possível verificar o desvio da proporção do sexo para fêmeas.

No entanto, sabe-se que apesar do gradiente de densidade ser capaz de separar os espermatozoides “X” e “Y” com menor custo e sem causar danos à viabilidade espermática, esta técnica apresenta somente uma precisão de 70%. Além disso, em estudos anteriores utilizando o gradiente descontínuo de densidade de *Percoll*[®], Lima et al. (2000) observaram muitas dificuldades que impedem a aplicação comercial, como a impossibilidade de armazenamento do gradiente, que deve ser usado imediatamente após a coleta ou a descongelação do sêmen, e a dificuldade para preparar diversas camadas podendo aumentar a variabilidade das amostras.

Citometria de fluxo

A técnica da citometria de fluxo consiste na emissão de raios *laser*, coloração diferencial dos espermatozoides e as forças hidrodinâmicas que os direcionam durante a separação (Garner, 2006).

A sexagem dos espermatozoides no citômetro de fluxo baseia-se na intensidade de fluorescência após a adição de um corante florescente. Esta técnica permite a separação de 100 células/segundo, permitindo então que em 5-6 horas obtenha-se 2×10^6 espermatozoides, tendo uma acurácia de 90% (Johnson et al., 1994).

A avaliação da separação de espermatozoides contendo cromossomo “X” ou “Y” através de citometria de



fluxo baseada na análise de seu DNA é difícil quando comparada com outros tipos de células, devido a compactação excessiva da cromatina na cabeça do espermatozoide que é morfologicamente plana, a qual provoca um alto índice de refração, ocasionando uma diferença entre a cabeça do espermatozoide e o meio circundante, resultando na emissão preferencial de luz no plano da célula. Devido a estas propriedades, a orientação da cabeça do espermatozoide em relação ao feixe de laser de excitação e aos detectores ópticos é crítica para a resolução (Johnson et al., 1994).

A triagem do fluxo de espermatozoides para a diferenciação da quantidade de DNA presente no cromossomo “X” e “Y” requer uma modificação da célula de fluxo e da ótica de coleta do citômetro de fluxo/classificador celular. Até à data, os sistemas de citometria de fluxo/classificação celular fabricados pela *Coulter Corporation*, Hialeah, FI (série EPICS V; EPICS 750, ELITE) e *Becton Dickinson Co.*, Mountain View, CA (FACStar Plus; FACStar; FACS 440) foram modificados para a classificação de espermatozoides. Cada sistema foi modificado para fornecer uma agulha de injeção de amostra chanfrada e um segundo detector de fluorescência localizado 0 "ao laser (Johnson et al., 1994).

Um novo sistema orientado por funil, desenvolvido a fim de potencializar a técnica, permite a separação dos espermatozoides em alta velocidade (11 milhões de espermatozoides “X”/hora) com 85 a 90% de pureza. Através deste, foi constatada a variação no conteúdo de DNA dos espermatozoides “X” e “Y”, com diferença de 2,8% no homem; 3,0% no coelho; 3,6% no suíno; 3,7% no garanhão; 3,8% no bovino; 3,9% no cão; e 4,2% nos ovinos (Johnson e Welch, 1999).

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

A sexagem por citometria de fluxo, por requerer a utilização de equipamento de alto custo e ter pouco rendimento de espermatozoides viáveis, tem seu uso mais indicado para tecnologias como a fertilização *in vitro* ou a micro injeção de espermatozoides, para maximizar o uso do pequeno número de espermatozoides separados (Windsor et al., 1993).

A redução da viabilidade do sêmen sexado por citometria de fluxo pode ser devido ao processo de separação, coloração, incubação, diluição, centrifugação e exposição a alta pressão e raios *laser*, que ocasionam a indução de uma capacitação prematura, resultando em uma sobrevivência mais curta e conseqüentemente uma redução da fertilidade, principalmente ao sêmen que será congelado. Porém, a utilização deste sêmen sexado *in natura* para FIV é vantajosa, não necessitando da indução da capacitação antes da fertilização, uma vez que o processo de sexagem já ocasiona essa capacitação (Johnson e Welch, 1999; Seidel e Garner, 2002).

Carvalho et al. (2018) observaram que ao realizarem a triagem sexual por citometria de fluxo, os espermatozoides sofriram alterações em suas características estruturais, demonstrando que o processo de sexagem compromete a capacidade de o espermatozoide permanecer ligado aos explantes das células do oviduto.

Blondin et al. (2009), ao realizarem a análise de espermatozoides bovinos sexados para fertilização *in vitro* de triagem para o embrião, observaram que nas análises da citometria de fluxo, o sêmen sexado e não sexado fresco possuía porcentagens significativamente menores de espermatozoides com reação acrossômica, menores porcentagens de espermatozoides com membranas danificadas e menor atividade mitocondrial, quando comparados ao sêmen sexado e não sexado descongelado.

Blondin et al. (2009) relataram ainda que de 82 embriões produzidos no laboratório com sêmen sexado por citometria de fluxo de diferentes touros, 92% eram do sexo feminino, conforme determinado com técnicas de PCR padrão, indicando a alta proporção de espermatozoides “X” em sêmen sexado.

Apesar das desvantagens e dos resultados de baixa qualidade do sêmen sexado, a triagem de fluxo desde que foi provada que alterava estatisticamente a proporção entre os sexos na prole viva, tem ganhado ampla aceitação como um meio efetivo e comercialmente viável de sexagem de espermatozoides. A técnica vem sendo refinada e melhorias tem sido feitas na resolução de medições, na orientação espermática, na estatística e no tempo até o ponto em que um único classificador pode produzir espermatozoides sexualmente suficientes para mais de 300 palhetas por dia. No entanto, o atual gargalo de produção pode mudar do classificador para outros aspectos do processo como o fornecimento de sêmen de animais de alta demanda ou processamento pós-classificação (em que o número de palhetas produzidas por hora pode exigir maiores recursos do laboratório). O que sugere a possibilidade de que uma nova tecnologia um pouco menos intensiva em capital, possa substituir rapidamente o citômetro de fluxo como técnica para a sexagem de espermatozoides (Sharpe e Evans, 2009).



Imunosexagem

Em 1955, o antígeno H-Y foi descrito pela primeira vez por Eichwald e Silmsler como sendo um antígeno específico relacionado ao sexo masculino. Os peptídeos H-Y são apresentados como um grande complexo de histocompatibilidade de moléculas sobre a superfície da célula, viabilizando a sexagem dos espermatozoides em larga escala através da imunologia pelas proteínas de superfície por anticorpos específicos, anti espermatozoide “X” e anti-espermatozoide “Y” (Hendriksen, 1999).

Souza et al. (1999), estudando proteínas macho-específicas de 19 KDa, a partir da membrana plasmática de bovinos, produziram anticorpos monoclonais a partir desta proteína e verificaram a eficiência desses anticorpos sobre o sêmen fresco de bovinos, obtendo-se 48,2% de espermatozoides marcados com a presença do clone C11F do anticorpo monoclonal.

Com base nessa linha de pesquisa, Matta (2000) desenvolveu um sistema utilizando anticorpos monoclonais contra a proteína sexo-específica associada à via clássica do complemento, onde se utilizam somente anticorpos para espermatozoides do sexo indesejado, o qual gerou uma patente.

Souza et al. (1999), verificaram a possibilidade de desenvolver um sistema utilizando anticorpos monoclonais para a sexagem espermática baseado nas diferentes expressões de proteínas na superfície de espermatozoides “X” e “Y”. A metodologia utiliza anticorpos monoclonais contra proteína sexo-específica associada à via clássica do complemento, utilizando somente anticorpos para espermatozoides do sexo indesejado.

Posteriormente, foram realizados estudos a fim de aprimorar a técnica de imunosexagem em bovinos, onde foram testadas diferentes concentrações do anticorpo e do complemento, e avaliadas as taxas de clivagens, formação de blastocistos e sexo dos embriões formados. No entanto, não foi observado diferença entre os resultados avaliados quanto a diferença de concentração testada, concluindo que a metodologia utilizando 20 µl de anticorpo e 20 µl de complemento pode ser adotada, pois há um menor consumo de reagentes e obtém-se bons resultados (Matta, 2003).

A presença do antígeno pôde ser verificada por meio do teste de citotoxicidade ou pela detecção de anticorpos macho específicos. Uma vez que, quando os espermatozoides são expostos ao anticorpo contra a proteína macho-específica, e, em seguida, a uma suspensão de complemento, apresentam-se lisados pelo antissoro anti-proteína macho-específica associado ao complemento, em mais de 50% (Matta, 2003).

Matta (2003), utilizando anticorpo monoclonal específico para espermatozoides “Y” associados à soro de cobaias, produziu 389 embriões em bovinos com sêmen fresco e obteve uma taxa variando entre 76,74% e 81,4%, sendo essas diferenças observadas associadas aos touros.

Este método tem demonstrado ser o mais simples, mais barato e sem efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário, além de não haver limite do número de espermatozoides para sexagem (Matta, 2003).

Tilburg et al. (2006) observaram que os anticorpos produzidos para a proteína de 39[°]1’ reconheceram uma banda proteica presente no plasma seminal de ovinos, a mesma banda proteica no espermatozoide e banda semelhante em tecido de macho. Eles observaram também a ausência desta banda em proteínas originárias de esôfago de fêmea, sugerindo a possibilidade de estarem trabalhando com proteínas macho específica. Diante disso, eles concluíram que nem todas as proteínas de 25 kDa são sexo-específicas e que apenas a proteína com tempo de retenção de 39[°]1’ está presente no tecido de macho.

Trabalhos a campo têm sido realizados utilizando doses de sêmen sexado com esta metodologia, tanto em rebanhos leiteiros quanto de corte. Em rebanho leiteiros, no primeiro trabalho realizado foi obtido um percentual de 77% de fêmeas nascidas de um total de 1023 crias. Em outro trabalho, no qual foi avaliado a sexagem dos embriões por ultrassonografia, resultou em 71,05% de prenhez positiva de um total de 38 vacas inseminadas, sendo 77,77% de fêmeas e 22,23% de machos. Também foi realizado um trabalho comparando o sêmen convencional, o imunosexado-HY e o sexado comercial, obtendo-se 50%, 79,73% e 41,89% de prenhez positiva, respectivamente (Matta, 2018, HY Biotecnologia, Informação pessoal).

Em rebanhos de corte, foram inseminadas três mil vacas, sendo mil para sêmen convencional, mil para imunosexado, e mil para o sexado comercial e foram obtidos 375, 600 e 360 machos, respectivamente. Realizando o mesmo delineamento experimental anterior, mas utilizando vacas de elite foram obtidas 375 fêmeas com sêmen convencional, 600 com o imunosexado e 270 com o sexado comercial (Matta, 2018, HY Biotecnologia, Informação pessoal).

Em ovinos, foram realizados estudos preliminares apenas com avaliações *in vitro* tanto do sêmen fresco como do descongelado, com 48% de motilidade espermática total, demonstrando inicialmente que a imunosexagem não afeta a qualidade seminal na espécie ovina (Matta, 2018, HY Biotecnologia, Informação pessoal).

Estudos vêm sendo realizados nessa linha de pesquisa, onde tem sido avaliado a eficácia e otimização dessa técnica em diversas espécies como em bovinos, suínos, equinos, ovinos, caprinos e cães. Nos bovinos e suínos que já foram realizados testes *in vivo*, as outras espécies ainda estão em fase de teste e validação.

Desta forma, a imunosexagem tem se mostrado um método mais simples, mais barato e sem efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário, além de não haver limite do número de espermatozoides para sexagem.



SexedULTRA™

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

Testes *in vitro* tem mostrado que o SexedULTRA™ mantém a integridade espermática melhor do que o método X-Y. Devido a esses resultados favoráveis *in vitro*, testes *in vivo* têm sido conduzidos para determinar se estas melhorias também ocorrem nas taxas de fertilidade a campo (Lenz et al., 2016).

O ensaio de campo inicial realizado comparando os métodos X-Y e SexedULTRA™, com um total de 6.930 novilhas Holandesas inseminadas em 41 rebanhos comerciais nos Estados Unidos, apresentou uma taxa de concepção maior no método SexedULTRA™ ($P < 0,001$) em comparação com o método X-Y ($45,7 \pm 1,7$ v. $41,2 \pm 1,6\%$). Este é o primeiro relato de uma melhoria nas taxas de concepção usando sêmen bovino classificado por sexo em uma década desde que se tornou disponível comercialmente (Lenz et al., 2016).

Thomas et al. (2017), ao analisarem o uso efetivo do sêmen SexedULTRA™ para inseminação artificial programada de novilhas de corte, sugeriram que o sêmen sexado pode ser usado efetivamente em IA programada de novilhas de corte após o protocolo de 14 dias utilizando o dispositivo intravaginal CIDR associado a prostaglandina (CIDR-PG) com *Split-Time Artificial Insemination* (STAI). Ressalta-se que as taxas médias de prenhez para IA com sêmen SexedULTRA™ apresentaram efetivamente 60% em relação ao sêmen convencional (52%) neste conjunto de dados.

Thomas et al. (2017) observaram também que as taxas totais de prenhez ao final dos 60 dias de reprodução não diferiram entre novilhas que receberam sêmen sexado em IA (89%; 376/422) e novilhas que receberam sêmen convencional em IA (89%; 382/429). Quanto à determinação do sexo fetal no diagnóstico da gestação foi possível em 389 das 401 novilhas que emprenharam após IA. As novilhas inseminadas com sêmen sexado evidenciaram 96% (171/178) de bezerras, enquanto que as novilhas inseminadas com sêmen convencional tiveram 49% (104/211) de bezerras.

Considerações finais

Desde a década de 90 do século passado, a evolução de algumas técnicas de separação de espermatozoide portadores do cromossomo “X” ou “Y” permitiu avanços significativos. No entanto, a expansão do uso do sêmen sexado depende da metodologia compatível com as características desejadas para garantir aumento da produtividade e avanço genético, tais como não afetar a capacidade fecundante, ser produzido em larga escala, garantir taxa de prenhez satisfatória, permitir a congelabilidade com redução das perdas e lesões espermáticas, apresentar separação eficiente dos espermatozoides em sêmen descongelado e apresentar baixo custo, devendo preocupar-se também com a acurácia do processamento e viabilidade após a descongelação. No entanto, nenhum método conseguiu reunir todas essas condições necessárias para sua utilização prática em nenhuma das espécies.

Assim, diversos aspectos relacionados à técnica de sexagem de células espermáticas ainda necessitam ser elucidados, sendo necessário dar continuidades às pesquisas, a fim de aprimorar ou desenvolver novas tecnologias que servirão para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e acessíveis aos produtores.

Referências

- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA.** Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.30-38, 2009.
- Carvalho JO, Sartori R, Rodello L, Mourão GB, Bicudo SD, Dode MAN.** Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. *Livestock Sci*, v.207, p.30-37, 2018.
- Garner DL.** Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v.65, n.5, p.943-957, 2006.
- González-Marín C, Góngora CE, Gilligan TB, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R.** In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.114, n.1, p.40-45, 2018.
- Hendriksen PJM.** Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology*, v.52, n.8, p.1295-1307, 1999.
- Hohenboken WD.** Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, v.52, n.8, p. 1421-1433, 1999.
- Lima VFMH, Ramalho MDT, Rodrigues LH.** Separation of X- and Y bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. *Theriogenology*, v.53, p.480, 2000. (Abstract.)
- Lima VFMH.** Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Rev Bras Zootec*, p.219-228, 2007.



- Lima VFMH, Moreira-Filho CA, Lucio AC, Resende MV.** Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. *Rev Bras Zootec*, v.40, n.8, p.1680-1685, 2011.
- Johnson LA, Welch GR.** Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, v.52, n.8, p.1323-1341, 1999.
- Johnson LA, Cran DG, Polge C.** Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- & Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. *Theriogenology*, v.41, p.51-56, 1994.
- Lenz RW, Gonzalez-Marin C, Gilligan TB, DeJarnette JM, Utt MD, Helser LA, Hasenpusch E, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R.** SexedULTRA™, a new method of processing sexsorted bovine sperm improves conception rates. *Reprod Fert Dev*, v.20, p.203-204, 2016.
- Matta MFR.** Método para sexagem de espermatozoides usando a via clássica do sistema complemento, com eliminação da via alternativa pela inativação da proteína “b”. 2000. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Patente N/Ref.: PI 0005045-8 A2.
- Matta CGF.** Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento. 2003. 55f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.
- Oliveira LZ, Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Lima VFMH.** Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.1, p.41-48, 2011.
- Souza CJP, Matta MFR, Cruz JM, Alves EW, Kanashiro MM, Silva JFS.** Monoclonal antibody against male-specific protein of 19 KDa from bovine spermatozoa: A successful methodology for immunosexing. *Rev Bras Zoot*, v.28, n.1, p.74-78, 1999.
- Resende VM, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lucio AC, Lima VFMH.** Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll and OptiPrep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Cien Anim Bras*, v.10, n.2, p.581-587, 2009.
- Resende VM, Biscarde CEA, Martins LEP, Kiya CK, Lima VFMH, Gusmão AL.** Centrifugação de espermatozoides ovinos em gradiente de densidade contínuo: Efeito sobre a taxa de prenhez e proporção do sexo. *Cien Anim Bras*, v.16, n.1, p.125-132, 2015.
- Seidel Jr GE, Garner DL.** Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, v.124, p.711-714, 2002.
- Seidel Jr GE.** Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, v.68, n.3, p.443-446, 2007.
- Sharpe JC, Evans KM.** Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.4-10, 2009.
- Thomas JM, Locke JWC, Vishwanath R, Hall JB, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ.** Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, v.98, p.88-93, 2017.
- Tilburg MFV, Machado OLT, Silva JFS, Matta CGF, Fagundes B, Matta MFR.** Identificação de antígeno macho-específico de ovino. *Rev Port Cien Vet*, v.101, p.231-233, 2006.
- Windsor DP, Evans G, White IG.** Sex predetermination by separation of x and y chromosome-bearing sperm: A review. *Reprod Fert Dev*, v.5, n.2, p.155-171, 1993.
-