VIVIANE GUIDI SVERZUT

**DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES
PORTADORES DE CROMOSSOMO X E Y NO SÊMEN SEXADO
MEDIANTE PCR EM TEMPO REAL**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

**Pirassununga-SP
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S969d Sverzut, Viviane Guidi
Determinação da porcentagem de espermatozóides
portadores de cromossomos X e Y no sêmen sexado mediante
PCR em tempo real / Viviane Guidi Sverzut. --
Pirassununga, 2011.
64 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Sêmen sexado 2. Citometria de fluxo 3. PCR em
tempo real 4. Gene SRY 5. Gene PLP. I. Título.

AGRADEÇO EM ESPECIAL,

*AO MEU MARIDO, GUSTAVO Z SVERZUT, POR TODO O AMOR,
CONFIANÇA E RESPEITO.*

POR SEMPRE ESTAR AO MEU LADO EM TODOS MOMENTOS.

AMO VOCÊ!

AGRADECIMENTOS

*A **Deus** pela minha saúde e oportunidade de realizar mais uma conquista.*

*Ao meu filho, **Ettore**, por me dar muita alegria com sua chegada no mesmo período em que realizei o projeto.*

*Aos meu pais, **Bruno e Beth**, pelo amor, apoio e dedicação em todas etapas de minha vida.*

*Ao **Prof. Flávio Vieira Meirelles**, pela orientação, apoio e aprendizado.*

*A todos meus familiares: **Vó Iná, Vó Cota, Bruna, Dê, Felipe, Bruno Otávio, Gislaine, Cezar, Dudu, Gabriel, Leila, João Luiz, Paula, Paulo, Helena, João Paulo, André, Heloísa, Maria's**. Agradeço por estarem sempre ao meu lado.*

*Ao amigo **Lucas M. Chaible**, pela sua dedicação e aprendizado durante a parte final do projeto que tanto precisei.*

*Ao **Prof. Dr. Heidge Fukumazu** pela atenção, ajuda e amizade.*

*À **Débora C. Oliveira** pela sua amizade desde os tempos da graduação.*

*Aos amigos e companheiros da empresa **Sexing Technologies** por toda a ajuda nos momentos de coletas das amostras e em especial ao amigo **Evanil Pires de Campos Filho** por sua confiança em mim depositada na realização do projeto.*

*À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, pela oportunidade de fazer a pós-graduação contando com sua ótima infra-estrutura e corpo docente.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo** pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.*

RESUMO

SVERZUT, V.G.. **Determinação da porcentagem de espermatozóides portadores de cromossomos X e Y no sêmen sexado mediante PCR em tempo real.** 2011. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

A produção animal atualmente conta com diferentes biotecnologias para aumentar sua produtividade, incluindo técnicas aplicadas na reprodução. A inseminação artificial, por exemplo, vem sendo aplicada há muitos anos e de maneira extensiva. Esta tem como objetivo o aproveitamento de apenas um ejaculado em diversas prenhez viabilizando a realização de testes de progênie e um grande aproveitamento de touros melhoradores. Atualmente essa técnica pode contar com um material ainda mais específico, o sêmen sexado que possui maior porcentagem (acima de 87%) de espermatozóides portadores de cromossomo X ou Y resultando numa progênie com o sexo predeterminado. A pré-seleção do sexo vem sendo estudada desde final dos anos 70, uma das linhas de pesquisa resultaram no desenvolvimento de um equipamento, o citômetro de fluxo, em que a célula espermática tem seu conteúdo de DNA estimado e, na seqüência é orientado para separação. Atualmente essa técnica é utilizada para produção de sêmen sexado comercialmente, anteriormente à comercialização do produto, a confirmação da taxa de separação dos cromossomos X e Y é realizada pelo próprio equipamento, o que acrescenta um custo operacional e pode introduzir um viés na confirmação da taxa de sexagem. Sendo assim o objetivo desse trabalho foi elaborar um protocolo de confirmação da taxa de sexagem mediante PCR em tempo real, utilizando sonda TaqMan[®] em regiões dos genes X-específico (PLP) e Y-específico (SRY). Foram analisadas duas sub-espécies de bovinos (*Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*), sendo 21 doses de sêmen sexado X, 21 doses de sêmen sexado Y e 42 doses de sêmen não sexado (controle). A extração do DNA foi desenvolvida com a utilização de di-etiltreitol (DTT) e isotiocianato de guanidina. As amostras foram, em seguida, submetidas à técnica de PCR em tempo real aplicando sondas específicas. Foi possível amplificar os fragmentos específicos dos cromossomos X e Y separadamente e em conjunto e estimar a proporção relativa entre ambos. Todavia a repetibilidade do teste e sua

acurácia não permitem recomendá-lo da maneira que se encontra para a aplicação na prática.

Palavras-chave: sêmen sexado, citometria de fluxo, PCR em tempo real, gene SRY, gene PLP.

ABSTRACT

SVERZUT, V.G.. **Determination of the proportion of X- and Y- bearing spermatozoa in bovine sexed semen by real time PCR.** 2011. 64p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

There are different biotechnologies to apply to increase the animal production nowadays, reproduction techniques are including. The artificial insemination (AI), for example, is a technique very used during many years ago and it is used at extensive production. The aim of this technique is to increase the numbers of pregnancies with just one ejaculation what will propose easier testing of offspring and better use of genetic selected bulls. At present the AI can associate a more specific material, the sexed semen, that contains a higher percentage (more than 87%) of X- or Y- bearing spermatozoa. Its application will result in a offspring with the desired sex. The sorting sex process has been studied since the 1970's, since then, some researchers have determined the cytometric sexing flow, a "promising technique" that allows the separation of the X-bearing chromosome sperm from the Y-bearing chromosome sperm based on the estimation of the DNA content in each measured cell. The cytometric flow is the unique commercial technique applied for mammalian species in many countries. Before the commercialization the bovine sexed semen has its percentage of the desired sex confirmed by using the same technique that sorted at the beginning of the process. This point can improve the cost and benefits the sorting technique. This way, the objective of this study was to determine a protocol of sex proportion confirmation by real time PCR using TaqMan[®] probe at X-specific gene (PLP) and Y-specific gene (SRY). Two subspecies of cattle semen were analyzed (*Bos primigenius taurus* and *Bos primigenius indicus*). Twenty-one sexed semen for female, other twenty-one sexed semen for male and forty-two non sexed semen were used in this research. The DNA extraction used DTT and guanidine isothiocyanate, and then the obtained samples were used to the real time PCR applying specific probes. This study allows the amplification in different reactions of specific products of X-chromosome bearing and Y-chromosome bearing. Putting the results together, it was possible to determine the relative proportion between the

products. But the repeatability and accuracy of the test don't permit use this technique in this way of practice.

Keywords: sexed semen, flow cytometer, real time PCR, SRY gene, PLP gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. “Cytonozzle [®] ”: equipamento que faz parte do citômetro de fluxo utilizado na sexagem de espermatozóides (a) “cytonozzle” em uma visão geral (b) partes que compõem o equipamento, a agulha permite a mesma orientação de saída dos espermatozóides.....	25
Figura 2. Citômetro de fluxo completo, foto obtida no dia 12 de Maio de 2008 no laboratório de sexagem da empresa Sexing Technologies situado em Sertãozinho-SP na CRV-Lagoa tirada por Viviane Guidi Sverzut.	26
Figura 3. (a) Ilustração das fitas de DNA abertas, após anelamento dos primers e por seguinte a extensão das cópia das fitas simples realizadas pela enzima polimerase (círculo verde) (b) Ciclo da reação da polimerase em cadeia.	31
Figura 4. A maioria dos genes dos mamíferos são ortólogos, sendo que mais da metade são genes de cópia única (azul escuro); outros ortólogos apresentam múltiplas cópias espécies-específicas (azul); alguns genes são ortólogos dentro da infra-classe dos placentários (rosa) e outros se perderam dentre a classe dos mamíferos (laranja). O gráfico também ilustra os genes que são homólogos (verde) e aqueles que são apenas específicos de linhagens (branco).....	34
Figura 5. Primers e sondas X e Y específicos.	38
Figura 6. (A) Sêmen sexado para fêmea: reação de PCR em tempo real para o gene PLP com diferentes concentrações de DNA, sendo 50 ng e 100 ng (curva verde). (B) Sêmen sexado para macho: reação de PCR em tempo real para o gene SRY com diferentes concentrações de DNA, sendo 50 ng e 100 ng (curva verde).	43
Figura 7. Imagem da eletroforese, em gel de agarose 2%, dos produtos amplificados em duplicata pela técnica de PCR em tempo real. Primeira coluna solução padrão de 100 pares de base. Gene X são os produtos oriundos da seqüência X específica do gene PLP e para o Gene Y, os produtos são cópias da seqüência Y específica do gene SRY. Amostras estão em duplicatas e testadas em duas concentrações de DNA (50 e 100ng).	44
Figura 8. Regressão linear do resultado das amplificações do primer Y (▪ superior) e do primer X (● inferior).	45

Figura 9. **(a)** Exemplo da curva de amplificação (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) da amostra de sêmen não sexado, como apresentam a mesma proporção de cromossomos X e Y apresentam a curva praticamente ao mesmo tempo. **(b)** curva de amplificação (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) no sêmen sexado de fêmea, as duplicatas superiores referem-se as cópias das sequências do gene PLP e as inferiores do SRY. 47

Figura 10. Distribuição da frequência dos cromossomos sexuais presentes no DNA extraído de amostras de sêmen não sexado analisadas pela técnica de PCR em tempo real e seus valores estatísticos. 47

Figura 11. Distribuição da porcentagem de cromossomos X provenientes do DNA extraído de espermatozoides das amostras de sêmen sexado de Fêmea em comparação com o tipo de confirmação de sexagem: (a) Citometria de fluxo e (b) PCR em tempo real. 49

Figura 12. Distribuição da porcentagem de cromossomos Y provenientes do DNA extraído de espermatozoides das amostras de sêmen sexado de Macho em comparação com o tipo de confirmação de sexagem: (a) Citometria de fluxo e (b) PCR em tempo real. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de cromossomos X presentes no sêmen sexado de fêmea e Y no sêmen sexado de macho avaliado mediante análise por citometria de fluxo. .	41
Tabela 2. Análise dos diferentes touros com ejaculados coletados para sexagem em relação às duas diferentes técnicas de confirmação da taxa de sexagem: pureza (re-análise em citômetro) e PCR em tempo real.	51
Tabela 3. Comparativo entre os grupos de raças em relação às técnicas de re-análise: citometria de fluxo e PCR em tempo real, para confirmação da taxa de sexagem.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
C	Citosina
Ct	Ciclo do “threshold”
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
dCt	Diferença entre os ciclos do “threshold”
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	di-etiltreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
FAM	6-carboxifluoresceína
FD&C#40	“Allura Red AC”
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
G	Guanidina
HOECHST 33342	Corante bisbenzimidazole produzido pela Invitrogen®
KDa	Quilodalton
M	Molar
mL	Mililitro
MSHR	Gene “Melanocyte-stimulating hormone receptor”
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLP	Gene “Proteolipid Protein”
psi	Libra força por polegada quadrada
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNP	Polimorfismo nuclear único
SRX	Gene “Sex- determining Region Y”
T	Timina
TE	Transferência de embrião
TRIS-HCL	Ácido bórico, EDTA e ácido clorídrico
Xq	Braço do cromossomo
XX	Cromossomos sexuais de fêmea em mamíferos
XY	Cromossomos sexuais de machos em mamíferos
ZZ	Cromossomos sexuais de machos em aves e cobras
ZW	Cromossomos sexuais de fêmeas em aves e cobras
Z0	Cromossomos sexuais de machos em alguns insetos
μL	microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	13
2. HIPÓTESE	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Importância da seleção do sexo da progênie na produção animal	17
3.2 Técnicas de sexagem de sêmen.....	20
3.2.1 Centrifugação em gradiente de densidade.....	22
3.2.2 Método Imunológico	23
3.2.3 Citometria de fluxo	24
3.3 Técnica de PCR em tempo real.....	30
3.4 Genes X e Y específico.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Obtenção do sêmen sexado e análise de pureza por citometria de fluxo.....	36
4.2 Extração do DNA.....	36
4.3 Primers e sondas	37
4.4 PCR-RT quantitativo	39
4.5 Análise Estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Análise da pureza por citometria de fluxo	41
5.2 Extração de DNA.....	42
5.3 Padronização das reações em PCR em tempo real.	42
5.4 Análises em PCR em tempo real.	45
6. CONCLUSÕES.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
8. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

A produção de bovinos apresenta-se em constante atualização dos seus meios de produção devido às pesquisas desenvolvidas em manejo, sanidade, melhoramento genético e reprodução, tornando-a cada vez mais eficiente. Dentre estas áreas, melhorias nas biotécnicas de reprodução proporcionam resultados rápidos, e aliados ao processo de melhoramento, mensuráveis na progênie.

Atualmente existem diversas biotecnologias que visam aumentar o número de descendentes em bovinos, sendo elas: inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) largamente aplicadas aos machos, e fertilização in vitro (FIV), transferência de embriões (TE) aplicadas às fêmeas, além da clonagem de animais e produção de animais transgênicos aplicáveis a ambos os sexos (THIBIER, 2005). Mais recentemente a escolha do sexo da progênie, seja mediante seleção do gameta masculino (espermatozóide) ou do embrião foram incorporados a esse conjunto de biotecnologias disponíveis comercialmente.

A pré seleção do sexo acelera o progresso genético, quando utilizado animais selecionados para determinadas características e também beneficia o manejo e a eficiência reprodutiva (MAXWELL et al., 2004).

A proporção de machos e fêmeas em um rebanho pode ter uma variação em relação ao esperado 1:1 (CLUTTON-BROCK; IASON, 1986), a razão dessa diferença ainda é desconhecida porém estudos sugerem que fatores fisiológicos e ambientais sejam possíveis causas dessa mudança (HARDY, 1997). Esta variação sempre foi motivo de curiosidade e desde há muito tempo tem-se estudado possíveis estratégias para controlar o sexo previamente ao nascimento do animal.

Técnicas como sexagem do feto através de ultra-sonografia tem sido utilizadas. De acordo com Curran et al. (1991) a identificação da genital através da ultra-sonografia pode ser feita em um único exame com alta acurácia sob condições de campo, no entanto apesar da acurácia a sexagem somente permite o conhecimento do sexo após o estabelecimento da gestação, o que envolve um alto custo ao produtor. Além da ultra-sonografia, a sexagem do feto também pode ser realizada através de técnicas de biopsia e posterior análise em PCR (BREDBACKA et al., 1995) ou análise pela técnica de FISH (LONERGAN et al., 2001).

Com a viabilização comercial da tecnologia de sexagem de sêmen, houve um interesse de aplicação em IA, TE e principalmente na FIV no mercado brasileiro,

tanto na produção de leite como na produção de corte (DELL'AQUA JR. et al., 2006), esta possibilidade diminui o interesse em utilizar as técnicas de sexagem de embrião.

A sexagem de sêmen, dadas as vantagens de selecionar os gametas com maior disponibilidade anteriormente à fecundação permite o aproveitamento dos gametas femininos (no gado de leite e mesmo em programas de seleção de gado de corte), via de regra mais valiosos, e vem se mostrando uma técnica muito promissora no sentido de otimizar a produção quando utilizada em associação com a IA, a IATF (inseminação artificial em tempo fixo). Esta otimização fica patente em um rebanho leiteiro, por exemplo, onde é importante incrementar o número de fêmeas nascidas. Para o rebanho de corte comercial, com algumas ressalvas o inverso também é válido.

No Brasil o mercado de sêmen sexado é para espécie bovina com aplicação na pecuária, sendo a maioria dos touros sexados da espécie zebuína e no sentido do cromossomo X. De fato 90% do sêmen sexado comercializado é selecionado para fêmea, e apenas 10% da comercialização para macho (ASBIA, 2007).

Existem diferentes técnicas de separação de espermatozóides em populações de acordo com o cromossomo sexual que possuem, na sua maioria estão ligadas à diferença de quantidade de DNA entre os espermatozóides portadores de cromossomos X e Y. Entre as técnicas possíveis a separação por centrifugação em gradiente de densidade tem apresentado resultados interessantes com a utilização de compostos de soluções isotônicas feitas a partir de partículas coloidais ou gradientes feitos com soluções isotônicas a partir de componentes iodatados (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003).

No entanto a técnica de citometria de fluxo é a única validada até o momento apresentando resultados consistentes viabilizando sua aplicação rotineira no Brasil e em outros países no mundo (GRAAF et al., 2009). No Brasil ela é realizada comercialmente pelas empresas Sexing Technologies e Goyaíke S.A., todos licenciados pela XY Inc[®] Sex Selection Technologies and Services (Fort Collins – Colorado/EUA). A Sexing Technologies, situada na empresa CRV-Lagoa (Sertãozinho-SP) desde 2005, foi a primeira a adquirir a licença da XY[®] em 2003 nos Estados Unidos e iniciou a comercialização em 2004 no estado do Texas em Navasota. Em 2007 ela adquiriu a XY[®] Inc, atualmente a Sexing Technologies está

presente em 7 países e possui outros projetos em andamento, o objetivo da empresa é tornar a técnica aplicável por todo o mundo.

A técnica de sexagem através da citometria de fluxo foi desenvolvida por Larry A. Johnson, em 1989 (JOHNSON, 2000), ela realiza a separação dos espermatozóides com cromossomo X dos com cromossomo Y mediante a estimativa individual de fluorescência emitida por um corante que se liga ao DNA (HOECHST 33342) após sua excitação pela incidência de laser pulsativo no comprimento de onda Ultra Violeta e, portanto, refere-se indiretamente à diferença do conteúdo de DNA.

Após o procedimento de sexagem e ênvase, o material depende da sua porcentagem de espermatozóides com o sexo pré-determinado (“pureza”) para ser comercializado. O método utilizado para quantificar a “pureza” é uma nova análise no citômetro de fluxo (WELCH; JOHNSON, 1999). A validação do produto por outra metodologia é essencial para o aperfeiçoamento da técnica (PARATI et al., 2006). Um método confiável que pode ser utilizado para determinar a porcentagem de cromossomo sexual atualmente é a técnica de FISH (“multicolour fluorescence in situ hybridization”), porém esse método é muito laborioso e de alto custo (RENS et al., 2001).

A técnica convencional de PCR pode determinar qualitativamente a relação de cromossomo X e Y em um sêmen, mas tem sido encontrada uma variação nessa relação dentro de diferentes lotes de sêmen não sexado de um mesmo reprodutor (CHANDLER et al., 1998; CHANDLER et al., 2002). O uso da reação de PCR em tempo real por meio de sondas fluorescentes possibilita tornar esses resultados ainda mais confiáveis, pois, além de qualitativo permite estudos quantitativos. Estudos estão sendo feitos com a utilização da técnica de PCR em tempo real com sondas fluorescentes e têm obtido resultados positivos com alto grau de acurácia, repetibilidade e reprodutibilidade (PARATI et al., 2006 ; JOERG et al., 2004).

Sendo assim o uso da técnica de PCR em tempo real no sêmen sexado para verificar a porcentagem de espermatozóides portadores do cromossomo desejado (X ou Y) é uma alternativa de interesse. Outras vantagens são que ela pode: utilizar pequena alíquota, ser feita em maior escala e não ocupar o equipamento de sexagem, o citômetro de fluxo, que poderá continuar sendo utilizado para produção ao invés de teste de qualidade.

Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram: desenvolver um protocolo simples de extração de DNA de células espermáticas sem a utilização de kits comerciais, determinar a proporção de espermatozóides portadores de cromossomos X e Y utilizando a técnica de PCR em tempo real aplicando conjunto de primers X e Y específicos juntamente com sondas TaqMan® em *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*. Finalmente avaliar o método de análise em citometria de fluxo em comparação à técnica de PCR em tempo real.

2. HIPÓTESE

A técnica de PCR em tempo real pode ser utilizada para determinar e consequentemente confirmar a taxa de porcentagem de espermatozóides portadores do cromossomo do sexo selecionado pela citometria de fluxo nas duas sub-espécies de bovinos (*Bos primigenius taurus* e *B. primigenius indicus*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância da seleção do sexo da progênie na produção animal

O interesse do homem pela seleção do sexo da progênie data de muitos anos, como na antiga população grega que acreditava que amputar o testículo esquerdo faria com que o homem produzisse somente filhos homens, pois o fator determinante do sexo masculino era proveniente do testículo direito, já Aristóteles dava conselhos sobre a posição do coito e a dieta que a mulher deveria ter para ter filhos homens (SCHENKER, 2002). Assim hipóteses e métodos têm sido sugeridos e testados para influenciar a proporção de nascimento dos descendentes do sexo masculino ou feminino (REUBINOFF; SCHENKER, 1996), mas além das barreiras científicas ainda encontradas para aplicação no cotidiano clínico para determinação da progênie humana há questões religiosas e culturais fortemente envolvidas para sua real utilização.

O entendimento dos diferentes tipos de mecanismo de determinação sexual trazem vantagens não somente em nível econômico e cultural, mas sim descobertas em vários níveis genéticos, organização do genoma, seu funcionamento e evolução são possíveis de serem compreendidos entre diferentes classes do reino animal (mamíferos, anfíbios, répteis e etc.) (GRAVES, 2008).

Em 1970, Barlow e Vossa documentaram a existência dos cromossomos sexuais em humanos utilizando o corante quinacrina (SEIDEL; GARNER, 2002). Foram estabelecidos diferentes sistemas sexuais dentre o reino animal que os determinam em macho ou fêmea: os mamíferos possuem o sistema XX:fêmea / XY:macho, onde o macho é o sexo heterogamético, ou seja, o macho possui os dois cromossomos sexuais diferentes daí a representação por duas letras diferentes; as aves e as cobras possuem ZZ:macho / ZW:fêmea, nesse caso a fêmea é o sexo heterogamético; e alguns insetos X0:macho / XX:fêmea, não tem o sexo heterogamético (GRAVES, 2008; ALBERTS et al., 2010).

Entretanto existem espécies animais que não possuem os cromossomos sexuais específicos visíveis como mencionados anteriormente, é o caso de alguns répteis, anfíbios e peixes onde coexistem a determinação sexual feita geneticamente, mas não se tem obrigatoriamente uma distinção (GRAVES, 2008). E

a determinação sexual ainda pode ser dada por fatores do ambiente, como em muitos outros répteis e alguns peixes que necessitam da influência da temperatura de incubação de seus ovos (GRAVES, 2008).

Com os estudos dos cromossomos sexuais, datados desde o início do século XX, a pré-seleção do sexo seguiu um direcionamento científico, e ao longo deste período até os dias de hoje métodos foram pesquisados para a separação de duas populações de espermatozóides. Até o momento, as técnicas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides portadores dos cromossomos X e Y, são as únicas comprovadas cientificamente que podem ser aplicadas comercialmente (GARNER, 2006; JOHNSON, 2000; JAFAR; FLINT, 1996; JOHNSON, 1995). Além das técnicas baseadas nos gametas masculinos existem biotecnologias ligadas à sexagem de embriões e não obstante a clonagem à partir de células em cultivo somáticas ou derivadas de embriões (SEIDEL, 2003).

No presente trabalho o sêmen sexado é da espécie bovina (*Bos primigenius taurus* e *B. primigenius indicus*), que tem como produtos da sua cadeia de produção o leite e/ou a carne. A tecnologia também é aplicada na formação de plantéis de animais com alto valor genético/comercial/afetivo, visando via de regra a produção de fêmeas (HOHENBOKEN, 1999). Esse aumento na proporção do número de indivíduos do sexo desejado incrementa a intensidade de seleção (BEKMAN et al., 1994).

A importância da seleção sexual da progênie na produção de leite está ligada a dois fatores: obtenção de uma gestação e parição com conseqüente produção de leite; e a produção de fêmeas para reposição, expansão do rebanho ou ainda para vendas (HOHENBOKEN, 1999). Dentre esses fatores mencionados está inserido o ganho genético que pode ser maximizado no rebanho com a utilização de sêmen sexado para fêmea permitindo maior aproveitamento da progênie de animais com alta produção (VAN VLECK et al., 1976; HABERMANN et al., 2005).

Alguns autores (VAN VLECK, 1981; HOHENBOOK, 1999; WEIGEL, 2004) estimam que a taxa de progresso genético no uso do sêmen sexado eleve 15% no teste de progênie quando comparado ao uso do sêmen convencional. Já Abdel-Azim e Schenll (2007) estudando 20 anos de seleção em gado de leite comercial e gado de elite quantificaram um ganho genético de 30% no 11º ano e decresceu para 9% no 20º ano, em comparação ao uso de sêmen não sexado.

A adoção do sêmen sexado no sistema produtivo de leite não depende somente do custo da técnica, já que as doses de sêmen sexado são em média 4 vezes mais caras do que as convencionais, mas também do mercado industrial que esse sistema produtivo está inserido, também válido para a cadeia produtiva de carne, assim alternativas de como se empregar o produto para que otimize a produção e não a torne onerosa são descritas por pesquisadores como Van Vleck e Everett (1976), Van Vleck (1981) e Dematawewaa e Berger (1998).

Para a produção de carne os benefícios do sêmen sexado estão relacionados a dois fatores: maior proporção de machos na progênie, pois existem diferenças entre os sexos nas características das carcaças - o valor de uma progênie com 100 % de machos será cerca de 34 % maior do que aquela composta de 50 % de machos (RUVUNA et al., 1992); e produção de fêmeas para a reposição com alto valor genético para fertilidade e ganho de peso, por exemplo (HOHENBOKEN, 1999).

Sendo assim, a aplicação dessa biotecnologia nos sistemas produtivos visam melhorar a produtividade animal, permitindo um direcionamento da produção, seja na produção de leite, na produção de carne ou no mercado de reprodutores de elite/programas de melhoramento genético. As populações obtidas do sêmen sexado não diferem nos índices zootécnicos, por exemplo, período de gestação, peso ao nascer, taxa de mortalidade e ganho de peso, das que utilizam o sêmen convencional (SEIDEL JR, 2003).

Devido a todos os fatores positivos mencionados, o uso do sêmen sexado tem incrementado a utilização da IA e TE na produção pecuária do Brasil, principalmente na aplicação do sêmen sexado de fêmea (BARUSELLI et al., 2007). De acordo com relatório da ASBIA (2010) o número de vendas de doses de sêmen, no geral, nos últimos 10 anos obteve uma evolução de 51,60%.

Por outro lado, muitos estudos tem sido feitos sobre a capacidade de fertilização do sêmen sexado ser menor do que o sêmen convencional devido ao processo de sexagem por citometria de fluxo danificar as células gaméticas (altas diluições, exposição ao laser, pressão e alta velocidade, período de processamento) e assim resultar em menores taxas de nascimento e aumento dos custos de produção. Em vacas de leite, Andersson et al. (2004) observaram taxas de prenhez de 21,0% naquelas inseminadas com sêmen sexado e de 46,0% para o grupo inseminado com sêmen convencional.

Já Baruselli et al. (2007) estudando vacas da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*), relataram não haver diferença na taxa de concepção utilizando a técnica de IATF com sêmen sexado na concentração comercializada ($2,1 \times 10^6$ espermatozóides) realizada 60 horas após a retirada do implante hormonal em comparação ao uso do sêmen convencional. O que ratifica-se a hipótese de que a IATF próxima à ovulação possibilita o aumento da taxa de prenhez em grupos de fêmeas inseminadas com sêmen sexado. Esse estudo vai de encontro à hipótese de que o processo de sexagem proporciona uma précapacitação do espermatozóide, assim, os gametas masculinos separados pela técnica de citometria de fluxo necessitam de menor tempo para a sua capacitação (LU; SEIDEL Jr., 2004).

Arruda (2007) concluiu, até o momento, não ter técnicas laboratoriais que predizem com exatidão o potencial de fertilidade do sêmen, pois os espermatozóides apresentam diferentes atributos para fertilização dos oócitos. E Bodmer et al. (2005) relataram, utilizando a mesma concentração do sêmen convencional e sêmen sexado para IA em vacas em lactação, 12 horas após detecção do cio, taxas de concepção similares (28,1% - convencional; 27,5%-sexado). Devido à impossibilidade de se determinar os fatores que podem influenciar na viabilidade espermática do sêmen sexado, a criopreservação deste requer que sejam feitas alterações e ou restrições nos protocolos convencionais de IA e IATF afim de se maximizar as taxas de prenhez (SCHENK et al., 1999).

Para a produção *in vitro* de embriões (PIV), a sexagem de sêmen também apresenta-se como uma importante ferramenta, pois permite alterar a proporção de produção de machos, que é sabido ser maior que de fêmea quando utilizado sêmen convencional, produzindo assim embriões de fêmeas que têm um maior valor de mercado (WHEELER et al., 2006).

3.2 Técnicas de sexagem de sêmen

Como mencionado anteriormente diversas técnicas estão sendo estudadas para realizar a separação de espermatozóides (“sexagem”) portadores de cromossomos X ou Y, e conseqüentemente obter produção de uma progênie com o sexo pré-determinado. Entre as técnicas de sexagem, a citometria de fluxo, baseada na diferença da quantidade de DNA presente nos cromossomos X e Y é a única

validada cientificamente (GRAAF et al., 2009; JOHNSON *et al.*, 1994). Porém outra técnica que também utiliza-se da diferença do conteúdo do núcleo espermático entre os espermatozóides portadores dos cromossomos X e Y, a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll é validada cientificamente (HOSSEPIAN DE LIMA, 2000) mas não possui repetibilidade e reprodutibilidade para ser aplicada comercialmente.

As primeiras notificações de diferença do conteúdo de DNA entre espermatozóides de mamíferos portadores de cromossomo X ou cromossomo Y foram estabelecidas em espermátides humanas através de análises em citometria de fluxo (OTTO et al., 1979). Esse estudo permitiu maior desenvolvimento da técnica de citometria e seu aprimoramento com uma melhor orientação da célula estudada, permitindo a leitura correta da fluorescência emitida e sua conseqüente mensuração (GARNER et al., 1983; PINKEL et al., 1982). Aplicando-se a técnica com suas melhorias foi possível determinar as diferenças existentes entre X e Y nas espécies domésticas de produção como: bovinos (3,8%), caneiros (3,6%), suínos (4,2%) e coelhos (3%) (GARNER et al., 1983).

Os bovinos possuem 60 cromossomos em cada célula somática, seus gametas masculinos são células haplóides contendo 29 cromossomos autossomos e um cromossomo sexual, X que originará uma fêmea (XX) após fecundação do oócito (29 autossomos + 1 cromossomo sexual X ou Y) que dará origem a um macho (XY).

Embora o conteúdo do DNA seja uma característica conservada entre os mamíferos, algumas diferenças no conteúdo ocorrem entre as espécies como mencionadas anteriormente e também entre raças de bovinos. Garner e colaboradores (1983) detectaram diferenças entre as raças de bovinos, sendo que touros da raça Jersey apresentam maior diferença (4,22%) quando comparada com as raças Angus (4,07%), Hereford (3,98%), Holandesa (4,01%) e Brahman (3,70%).

Atualmente a técnica de mensuração do conteúdo de DNA utilizando o citômetro de fluxo tem a precisão para identificar espermatozóides portadores de cromossomo X ou Y no ejaculado em pelo menos 23 espécies de mamíferos. (MAXWELL et al., 2004; SEIDEL; GARNER, 2002; O'BRIEN et al., 2002; GARNER, 2001; JOHNSON, 2000).

Além da citometria de fluxo, única técnica aplicada comercialmente, existem outras técnicas para a separação de espermatozóides em estudo.

3.2.1 Centrifugação em gradiente de densidade

O método de centrifugação em gradiente de densidade, como o próprio nome diz, envolve um processo de centrifugação baseando-se na diferença de densidade entre duas populações de espermatozóides, que por sua vez está relacionada a diferença de DNA dos cromossomo X e Y. Em bovinos essa diferença entre espermatozóides X e Y é de $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ ou 0,06% (CHANDLER et al., 1999; WINDSOR et al., 1993).

Na tentativa de separação dos espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade foram utilizados diferentes meios, tais como Ficoll-Metrizoato de Sódio e Percoll® (KANEKO et al., 1983; SHASTRY et al., 1977). Mais recentemente utilizaram-se Percoll® e OptiPrep® e foram obtido resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual e repetibilidade da técnica (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000, HOSSEPIAN DE LIMA, 1998).

Van Kooj e Van Ost (1992) examinaram populações de espermatozóides que foram sexados mediante centrifugação em gradiente de Percoll® pelo método de Southern blot utilizando sonda de DNA para distinguir locus específicos nos cromossomos X e Y e obtiveram uma razão de aproximadamente 1:1 espermatozóides portadores de cromossomo X e Y. Esse estudo demonstrou, portanto nenhum enriquecimento da população de espermatozóides para o sexo desejado e assim não seria suficiente para uma alteração significativa no nascimento da progênie.

Já Blottner et al. (1993) utilizaram centrifugação em gradiente de Percoll® para a separação dos espermatozóides bovinos portadores do cromossomo X dos portadores do cromossomo Y, este método propiciou um enriquecimento de mais de 75% de espermatozóides X na fração inferior confirmado pela técnica FISH. HOSSEPIAN DE LIMA et al. (2003) também descreveram, em patente, gradientes compostos de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias compostas de partículas coloidais e gradientes feitos com soluções isotônicas a partir de componentes iodatados, como o iodixanol, que permitem em uma única centrifugação separar as impurezas (partículas leves, espermatozóides imaturos, células e bactérias) dos espermatozóides viáveis e, dentre estes, separar os

espermatozóides X dos Y. A vantagem desta é a única centrifugação que permite, sem alterar a acuidade de separação dos espermatozóides X e Y, a diminuição das injúrias causadas nos espermatozóides pelas sucessivas centrifugações e manipulações e assim a preservação da resistência dos mesmos ao processo de congelamento.

Apesar da técnica apresentar resultados divergentes como descritos e diferenças de protocolos sua aplicação a título experimental é segura, falta no entanto incrementar sua repetibilidade para que seja aplicada comercialmente (STILL et al., 1998).

3.2.2 Método Imunológico

Entre os diferentes estudos na procura da sexagem dos espermatozóides portadores de cromossomos X e Y, existe o método imunológico que se baseia na determinação de proteínas sexo específico encontradas na membrana espermática.

Blecher et al. (1999) relataram a identificação e isolamento de proteínas específicas do sexo para obtenção de anticorpos específicos do sexo masculino e do sexo feminino que poderiam ser utilizados para sexagem de sêmen. Após a incubação com espermatozóides bovinos, os anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino promoveram a aglutinação de 50%, as células que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 106 embriões, dos quais apenas 72 puderam ser sexados por citogenética sendo 92% destes do sexo masculino. Não foi relatado se a incubação de espermatozóides com anticorpos antiproteínas macho específica também promoveu o desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino. Os autores postularam a presença de diferentes proteínas cromossomais específicas do sexo, na superfície dos espermatozóides X e Y, originárias de transcrição e tradução pós-meiótica e que não seriam capazes de atravessar as pontes interespermáticas, desse modo a técnica necessita de maior aprimoramento para conseguir realizar a sexagem com eficiência.

Já Hendriksen et al. (1999) reportaram insucesso no sentido de estabelecer diferenças de proteínas de membrana entre os espermatozóides X e Y impossibilitando assim a sexagem por esse método imunológico. Apesar de resultados contraditórios as pesquisas para padronizar essa técnica ainda estão em

andamento, Sang et al. (2011) identificou uma proteína de 3kDa como sexo específica e têm potencial para ser utilizada na técnica imunológica para sexagem de sêmen. Quando comprovada cientificamente terá um grande interesse devido ao custo, muito menos onerosa que as outras metodologias de sexagem.

3.2.3 Citometria de fluxo

Foi através da técnica de citometria de fluxo que se iniciou as análises e mensurações do conteúdo do DNA entre os espermatozóides portadores de cromossomo X ou Y entre diferentes tipos de espécies de mamíferos. No início, esse processo era altamente severo e danificava totalmente o espermatozóide devido à remoção da sua cauda e da membrana que envolve o núcleo para que se pudesse corar o material genético com o corante 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (PINKEL et al., 1982) resultando assim na morte celular.

JOHNSON et al. (1987) descreveram um novo método para preparação dos espermatozóides utilizando o corante vital bisbenzimidazol, Hoechst 33342, que se liga ao DNA, permitindo sua aplicação com alta resolução e separação dos carreadores de cromossomo X e Y pela citometria de fluxo. Pesquisas foram feitas e comprovaram resultados positivos em relação à análise dos espermatozóides viáveis portadores de cromossomo X dos portadores de cromossomo Y com uma acurácia de 85 a 95% através da técnica de citometria de fluxo (JOHNSON, 2000; SEIDEL et al., 1999; WELCH; JOHNSON, 1999).

Além dos avanços dos reagentes utilizados na técnica de citometria de fluxo para a sexagem de sêmen, também foram feitos avanços no citômetro possibilitando a separação das células. O citômetro desenvolvido pela XY Inc é chamado de MoFlo® e possui em particular um aparato chamado “cytonozzle” (Figura 1). O “cytonozzle” foi desenvolvido na década de 80 e possibilitou a orientação e consequente separação das células no citômetro de fluxo, essa orientação é possível, pois esse equipamento possui uma agulha chanfrada e aplainada que ocasiona uma pressão hidrostática resultando num fluxo laminar, ou seja, força cada espermatozóide seguir uma mesma orientação um após o outro. Devido à alta pressão formada pelo fluxo laminar a cabeça do espermatozóide adquire uma mesma posição e assim permite a mensuração da fluorescência de cor

azul emitida pelo núcleo espermático corado quando excitado pelo laser de diodo pulsátil com comprimento de onda de 351 e 364nm (Spectra-Physics®) na saída da agulha do “cytonozzle”.

Figura 1. “Cytonozzle®”: equipamento que faz parte do citômetro de fluxo utilizado na sexagem de espermatozoides (a) “cytonozzle” em uma visão geral (b) partes que compõem o equipamento, a agulha permite a mesma orientação de saída dos espermatozoides.

A técnica resumidamente tem início com os espermatozoides sendo corados com Hoechst 33342. Este é permeável a membrana citoplasmática e nuclear ligando-se fortemente e de maneira específica a quatro pares de bases AATT na curvatura menor da dupla hélice do DNA (GARNER, 2009). Em seguida, as células passam pelo citômetro de fluxo através do “cytonozzle” para serem expostos ao laser Ultra Violeta, após saem um a um em gotas envolvidos por um fluído protetor (“sheat fluid”) devido a vibração do mecanismo piezoelétrico (GARNER, 2006 MAXWELL et al, 2004). E finalmente as gotas contendo um único espermatozoide são carregadas eletricamente e passam por um fluxo eletrostático para a separação, o feixe de gotas separadas formado caem em tubos de coletas contendo diluidor à base de gema de ovo. É possível a separação em até 3 grupos de espermatozoides, sendo eles: portadores de cromossomos X, Y e mortos ou não sexados (Figura 2). Para tornar a técnica mais eficiente somente os espermatozoides portadores do cromossomos sexuais desejados são separados dos demais, ou seja, a separação via de regra ocorre em dois grupos.

Para o processamento do sêmen sexado, os tubos coletores são centrifugados e o precipitado contendo o sêmen é diluído na concentração desejada, após são envasados em palhetas e essas são criopreservadas em nitrogênio líquido para comercialização.

Figura 2. Citômetro de fluxo completo, foto obtida no dia 12 de Maio de 2008 no laboratório de sexagem da empresa Sexing Technologies situado em Sertãozinho-SP na CRV-Lagoa tirada por Viviane Guidi Sverzut (a) Local onde ocorre a sexagem propriamente dita, sendo na parte superior localizado o "cytonozzle" e na parte inferior as placas elétricas terminando no tubo de coleta contendo meio para preservação do sêmen (b) Ilustração da separação dos espermatozoides iniciando com a orientação das células gaméticas no "cytonozzle" através da agulha aplainada e chanfrada, saída em formação de microgotas, com apenas uma célula em cada, devido a vibração elétrica por cristal "piezo", leitura pelo laser e posterior aplicação de carga elétrica e finalmente as microgotas são defletidas conforme passam pelas placas elétricas de acordo com a carga elétrica que possuem (atração e/ou repulsão) e caem nos tubos contendo meio para preservação do sêmen até o final da sexagem (fonte: <http://www.sexingtechnologies.com>, capturada e adaptada em 13 de Maio de 2008).

Todo esse sistema possibilita a separação de espermatozóides sob alta velocidade (WELCH; JOHNSON, 1999), com 85 a 90% de eficiência, resultando na separação de aproximadamente 11 milhões de espermatozóides portadores do cromossomo desejado por hora. Todas as evoluções da técnica corresponderam numa melhoria de 30 a 60 vezes na quantidade de células obtidas dos primeiros estudos realizados em coelhos (WELCH; JOHNSON, 1999; JOHNSON et al., 1999). Mesmo assim o aprimoramento da técnica vem sendo realizado, pois por exemplo ainda tem-se a perda de 20% dos espermatozóides que são separados durante o processamento e ênvase em palhetas (GARNER, 2006).

Assim a pré-seleção sexual da progênie é aplicada em diferentes tipos de animais de produção (WELCH; JOHNSON, 1999), obtendo produtos morfológicamente normais e capazes de se reproduzir em sucessivas gerações (JOHNSON; PINKEL, 1986).

Em humanos a separação através da citometria de fluxo também é eficaz, mas não é aplicada clinicamente devido à sua indagação sobre segurança e questões éticas (STILL et al., 1998).

Como a diferença de quantidade existente entre o conteúdo do DNA dos cromossomos X e Y presentes nos espermatozóides difere entre as diferentes espécies e raças de animais, existe um grau de dificuldade na separação em cada indivíduo. Além disso outros fatores que dificultam ou facilitam a técnica de citometria de fluxo para sexagem são o formato e a área da cabeça do gameta masculino. O espermatozóide é composto por cabeça, peça intermediária e cauda, sendo que na cabeça encontra-se o material genético herdado mendelianamente. “A maioria dos animais domésticos possuem a cabeça aplainada e oval com exceção dos roedores e monotrêmatas” (citação de GARNER, 2006 do trabalho de AUSTIN, 1965). A sexagem dos espermatozóides portadores de cabeças aplainadas e ovais, como os bovinos e ovinos, são mais facilmente e rapidamente orientados pelo processo hidrodinâmico da técnica do que aqueles que são mais redondos e angulares, como nos humanos e equinos (GARNER, 2006).

O procedimento de marcação do DNA pelo corante Hoechst 33342 também influencia no processo, já que, de acordo com protocolo do produto disponibilizado pela Invitrogen (Molecular ProbesTM Invitrogen Detection Technologies), ele atua

em todos ácidos nucleicos, mas fitas duplas de DNA ricas em A-T fluorescem dois patamares a mais do que aquelas ricas em G-C.

Devido a todos os fatores que influenciam na sexagem é preciso, para torná-la eficaz, algumas modificações no protocolo adequando-o para um melhor aproveitamento em cada indivíduo.

Para a melhoria da técnica estudos tem sido feitos para analisar e minimizar os danos causados aos espermatozóides devido à sexagem submeter as células à: corantes, exposição ao laser, alta pressão e velocidade, processos seqüenciais de diluições e resistência ao grande período do processo total da técnica antes da sua criopreservação (GARNER, 2009; SUH; SCHENK, 2003; SUH et al., 2005). Como todas as etapas do processo adicionam injúrias à célula gamética masculina, todas devem ser levadas em consideração para diminuir os danos, por exemplo, a pressão do fluido do citômetro quando diminuída de 50 para 40 psi resulta numa maior taxa de sobrevivência dos espermatozóides mantendo uma boa resolução para a sexagem (SUH et al., 2005). Mas essa menor pressão pode não ser suficiente para a separação nas espécies que possuem cabeças mais angulares ou redondas, portanto, para cada espécie animal devem-se realizar alterações no protocolo de sexagem minimizando os possíveis danos às células.

Durante o processo de sexagem as células gaméticas que possuem defeitos de membrana e também as mortas são coradas com um corante alimentício (FD&C#40, Warner Jenkinson, St Louis, USA), pois ele é impermeável à membrana celular íntegra. Já quando a célula está morta ou alterada resultando em um gameta com defeitos, a membrana citoplasmática modifica-se e se torna permeável ao corante alimentício, este se combina com o Hoechst 33342 e inibe sua fluorescência (GARNER, 2006). Essa célula defeituosa e/ou morta é então descartada, o que corrobora com a qualidade do sêmen sexado.

Apesar do descarte das células mortas e/ou com defeitos de membrana ser um ótimo suporte ao sêmen sexado, a concentração de espermatozóides contidos na dose comercializada deste (2×10^6 células/palheta) poderia ser motivo para diminuir a taxa de prenhez em relação ao sêmen convencional ($15 - 20 \times 10^6$ células/palheta) (GARNER, 2001). Andersson et al. (2004), em vacas de leite, observaram taxas de prenhez de 21,0% para o grupo de vacas inseminadas com sêmen sexado e de 46,0% para o grupo inseminado com sêmen convencional, porém apesar da menor taxa de prenhez quando utilizado o sêmen sexado, o grupo

deste apresentou maior proporção de fêmeas nascidas, sendo de 83% no sexado e 49% no convencional, assim a utilização do sêmen sexado deve levar em conta o valor que o sexo pré-determinado irá adicionar ao seu rebanho o que no final do estudo operacional do rebanho faz com que esse produto aumente a lucratividade da produção. O custo das doses de sêmen sexado depende do animal comercializado, no geral corresponde três vezes mais o valor da dose convencional.

Com objetivo de demonstrar que a baixa concentração de espermatozóides no sêmen sexado era causa da baixa taxa de prenhez e não outros fatores ligados à qualidade do sêmen, Bodmer et al. (2005) utilizaram a mesma concentração de espermatozóides por IA em vacas em lactação inseminadas 12 horas após a detecção de cio, e observaram taxas de concepção (30 a 40 dias após IA) similares entre os grupos sexado (27,5%) e convencional (28,1%).

Baruselli et al. (2007), estudando vacas da raça Nelore (*B. primigenus indicus*), relataram que não existem diferenças nas taxas de concepção quando a IATF com sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ espermatozóides/dose) é realizada 60 horas após a retirada do implante de progestágeno, quando comparada ao uso do sêmen convencional, ratificando a hipótese de que a IATF próxima ao momento da ovulação aumenta a taxa de concepção do grupo de fêmeas inseminadas com sêmen sexado.

Schenk et al. (2006) estudaram o efeito do tipo de sêmen (sexado x convencional) e de diferentes doses de sêmen sexado na quantidade e qualidade de embriões produzidos de vacas e novilhas de corte e de novilhas de leite superovuladas. Nas vacas e novilhas de corte, estes autores observaram que o grupo que recebeu sêmen convencional apresentou significativamente maior porcentagem de ovócitos fertilizados (69,0%), quando comparada àquele que recebeu sêmen sexado com 10×10^6 espermatozóides/dose (49,0%) e com 20×10^6 espermatozóides/dose (40,0%). Além disso, o número de embriões transferíveis obtidos de novilhas de leite foi menor no grupo que recebeu sêmen sexado na dose de 20×10^6 espermatozóides/dose, quando comparado ao grupo que recebeu sêmen convencional na dose de 40×10^6 espermatozóides por dose. No entanto, a taxa de concepção foi similar para embriões originados dos grupos sexado (67,0%) e convencional (63,0%).

A deposição do sêmen pode interferir na taxa de prenhez, Kurykin et al. (2007) estudaram diferentes locais de deposição: corpo uterino, corno uterino ou

junção útero-tubárica e observaram que as taxas de prenhez foram similares em novilhas de leite utilizando sêmen sexado. Desse modo não é necessário, com algumas ressalvas (como aspectos nutricionais, idade do rebanho), um protocolo de inseminação diferente do utilizando com sêmen convencional.

3.3 Técnica de PCR em tempo real

Atualmente, muitos diagnósticos científicos e médicos têm utilizado uma importante ferramenta para analisar quantitativamente ácidos nucleicos (DNA) ou proteínas presente nas reações em estudo, é a chamada reação da polimerase em cadeia em tempo real desenvolvida por Higuchi et al. (1992), sendo essa um incremento à PCR original (reação da polimerase em cadeia) que foi desenvolvida por Kary Mullis em 1985 no diagnóstico da anemia falciforme por amplificação enzimática da β -globulina.

Na reação da polimerase em cadeia em tempo real a quantidade de produtos formados é monitorada durante o processo devido ao registro de fluorescência emitida pelos corantes ou pelas sondas introduzidas na mistura da reação, sendo essa emissão proporcional à quantidade de produtos formados e ao número de ciclos de amplificação necessário para obter um determinado número de moléculas registradas, após assumir o grau de eficiência da reação (Rutledge; Cote, 2003), pode-se calcular a quantidade inicial da molécula alvo amplificada. Hoje em dia, devido ao grande número de reagentes químicos de detecção eficiente, a instrumentos altamente sensíveis e softwares disponíveis o número de moléculas de DNA de uma sequência particular de um complexo de reação pode ser determinado com alta acurácia (KUBISTA et al., 2006). O sistema de quantificação em tempo real tem diversas aplicações como: estudo do padrão de expressão gênica, identificação de alelos em DNA genômico, análises de sequências virais, bacterianas ou de protozoários, análise de patógenos, análise de produtos transgênicos, detecção de regiões com polimorfismo nucleotídico único (SNP), aberrações cromossômicas, detecção de proteínas e mais recentemente para análise da porcentagem de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y no sêmen sexado (PARATI et al., 2006; JOERG et al., 2004).

A PCR em tempo real utiliza como matéria-prima o DNA que pode ser fita simples ou dupla. Para que a reação ocorra são necessários: dois oligonucleotídeos iniciantes (primers) que se combinam com a região específica que deverá ser amplificada, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) que consistem nos quatros nucleotídeos trifosfatos, enzima polimerase termicamente estável e íons de magnésio na solução. A reação acontece mediante um ciclo de temperaturas (Figura 3), sendo que inicialmente a temperatura é elevada (94°C - 96°C) para separar as fitas de DNA helicoidal em duas fitas simples, após diminui-se a temperatura (37°C - 65°C) para que os primers se anelem à fita base, e finalmente a temperatura alcança aproximadamente 72°C sendo essa a temperatura ótima, no geral, para a extensão dos primers realizada pela enzima polimerase e incorporação dos dNTPs (KUBISTA et al., 2006).

Figura 3. (a) Ilustração das fitas de DNA abertas, após anelamento dos primers e por seguinte a extensão das cópia das fitas simples realizadas pela enzima polimerase (círculo verde) (b) Ciclo da reação da polimerase em cadeia.

A reação de PCR em tempo real necessita de todos os componentes como na reação de PCR original e um marcador fluorescente que se liga ao produto formado gerando um sinal fluorescente que reflete na quantidade deste formado. Nos ciclos iniciais o sinal é fraco e não permite que seja distinguido, a partir do momento que os produtos acumulam-se o sinal emitido aumenta exponencialmente e finalmente os sinais param e a solução satura-se devido a limites críticos de determinado reagente, que pode ser os primers, a sonda ou os dNTPs (KUBISTA et al., 2001).

O ponto final da reação, ou seja, o ponto onde a amplificação atinge o platô não é informativo a respeito da quantidade de moléculas alvo iniciais, ele apenas distingue uma amostra positiva de uma negativa.

Por outro lado, as curvas obtidas são observadas durante o período de aumento exponencial da fluorescência. Essa reflete na diferença de quantidade inicial de moléculas alvo que é quantificada pela comparação do número de ciclos requisitados pela curva até alcançar um determinado sinal de fluorescência (linha de corte ou do inglês threshold). O número de ciclos necessários para alcançar esse determinado valor é chamado de C_T . Espera-se que as curvas de resposta à amplificação sejam paralelas na fase de crescimento e o ponto em que elas atinjam a linha de corte não seja num nível crítico.

Existem diversos softwares que utilizam diferentes métodos e algoritmos para calcular o valor determinado para linha de corte e na sua maioria o usuário pode modificá-lo manualmente. Por isso deve-se evitar comparar valores de C_T entre experimentos, e incluir um referencial a cada corrida para que as outras possam ser relacionadas (KUBISTA et al., 2001).

Os marcadores fluorescentes utilizados atualmente na reação de PCR em tempo real podem ser específicos ou inespecíficos, como o último identifica qualquer seqüência de DNA amplificada deve-se tomar cuidado com a presença de indesejáveis produtos, como os dímeros, que são regiões complementares dos primers, particularmente no terminal 3'. Para evitar a formação de dímeros na análise quantitativa deve-se atentar a quantidade de moléculas alvo, pois para sua amplificação e para a formação de dímeros existe uma competição por reagentes.

No trabalho inicial de Higuchi et al. (1992) foram utilizados marcadores clássicos que atuam intercalando as bases nitrogenadas da molécula de DNA, por exemplo, o brometo de etídeo, mas esse tipo de corante interferiu na reação da polimerase e assim tornou-se mais popular a utilização de corantes de cianina assimétrico, como o SYBR Green I (ZIPPER et al., 2004; BENGTSSON et al., 2003). Esse último é um marcador inespecífico e assim quando utilizado deve-se controlar rigorosamente a presença de dímeros.

Exemplos de marcadores fluorescentes específicos são: sondas TaqMan (HOLLAND et al., 1991), sondas hibridizadas (CAPLIN et al., 1999) e sondas Lion (<http://www.biotoools.net>) entre outras. As sondas não detectam a formação de dímeros e, portanto as suas utilizações podem esconder um erro da reação. Sendo

assim o controle da formação de produtos indesejáveis deve ser controlada sempre.

A grande vantagem da utilização das sondas é a possibilidade de amplificação de vários produtos no mesmo tubo e suas detecções em paralelo (WITTER et al., 2001).

3.4 Genes X e Y específico

Os genes são segmentos de DNA que codificam cadeias polipeptídicas e RNAs, estudos para a determinação de quantos e quais genes compõem cada cromossomo de diversas espécies animais tem sido feitos, são os chamados projetos genomas. Mesmo que o genoma não seja totalmente conhecido, é possível fazer a clonagem de determinados genes quando esses tem sua sequência genômica conhecida. As cópias do gene ou pelo menos da parte dele que é conhecida podem ser enormemente amplificada usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ARNHEIM; ERLICH, 1992). O DNA amplificado pode ser clonado diretamente ou usado em uma variedade de procedimentos analíticos. Elsik et al. (2009) relataram que o genoma bovino possui no mínimo 22.000 pares de genes, sendo que 14.345 são ortólogos à outras espécies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Monodelphis domestica*-marsupial, *Ornithorhynchus anatinus*- monotremata). Dentre os genes ortólogos das espécies mencionadas muitos são genes com múltiplas cópias como demonstra a figura abaixo (Figura 4). Nos estudos das regiões espécie-específicas nos cromossomos do bovino, foram constatados pontos de evolução com alta densidade de segmentos em repetição, exemplo de genes não ortólogos são aqueles associados à lactação e ao sistema imune, que sofreram variações em relação à outras espécies.

Figura 4. A maioria dos genes dos mamíferos são ortólogos, sendo que mais da metade são genes de cópia única (azul escuro); outros ortólogos apresentam múltiplas cópias espécies-específicas (azul); alguns genes são ortólogos dentro da infra-classe dos placentários (rosa) e outros se perderam dentro a classe dos mamíferos (laranja). O gráfico também ilustra os genes que são homólogos (verde) e aqueles que são apenas específicos de linhagens (branco).

No presente trabalho foi utilizado PCR em tempo real na confirmação da taxa de sexagem realizada pela citometria de fluxo, para isso foi necessário o conhecimento de regiões sexo específicas do genoma com apenas uma cópia. Utilizaram-se parte da sequência genômica do cromossomo X específico - PLP (proteolipid protein), e do cromossomo Y específico - SRY (sex determining region Y).

O gene PLP está presente com uma cópia simples no genoma, localizado no cromossomo X (WIGHT; DOBRETSOVA, 2004), em humanos está situado no meio do braço longo (bandas Xq13 – Xq22) (WILLARD; RIORDAN, 1985) e não possui região homóloga no cromossomo Y por isso ele é X específico. Este gene é altamente conservado entre espécies, sendo idênticos em humanos, camundongos e ratos no nível dos aminoácidos traduzidos (GRAVES, 2008; YOOL et al., 2000). A função dele é codificar uma proteína proteolipídica que faz parte da composição da bainha de mielina presente no sistema nervoso central. Assim pontos de mutação podem causar doenças neuropáticas já que a proteína está ligada ao desenvolvimento dos neurônios, estudos estão sendo feitos em busca de uma

padronização dos tipos de mutações encontradas e seus diferentes graus de desordem provocada (YOOL et al., 2000).

Já o gene SRY é localizado no braço curto do cromossomo Y em humanos e no braço longo nos bovinos, e como o gene PLP, não possui região homóloga no cromossomo X, portanto, é Y específico. O cromossomo Y que representa no sistema sexual em mamíferos, o sexo específico, assim como o W em aves, é altamente variável (GRAVES, 2008). Este gene é responsável pela determinação sexual testicular, realizando o primeiro passo da diferenciação sexual (genético), ou seja, na sua presença há a diferenciação da gônada em testículo, quando na falta deste a indiferenciação da gônada faz com que mais tarde ela se desenvolva em ovário (WATERS et al., 2007). Apesar da seqüência do gene SRY não ser altamente conservada entre os mamíferos, sua região ativa, o box HMG, é conservada e assim a produção de proteína e a função regulatória é a mesma entre a maior parte das espécies (MARGARIT et al., 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do sêmen sexado e análise de pureza por citometria de fluxo

As doses de sêmen resfriadas foram coletadas no laboratório de sexagem animal – Sexing Technologies Brazil, situado na empresa CRV-Lagoa na cidade de Sertãozinho-SP. Foram coletadas amostras de 42 ejaculados de quatro raças diferentes, sendo duas provenientes da sub-espécie européia (*Bos primigenius taurus*), Holandês e Angus, e duas da sub-espécie zebuína (*Bos primigenius indicus*), Nelore e Gir leiteiro, visando analisar diferenças provenientes entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo. Primeiramente obtiveram-se alíquotas de 50 µl de cada ejaculado para compor o grupo controle de sêmen não sexado.

Após todo o processo de sexagem por citometria de fluxo e anteriormente ao ênvase foram retirados 250 µl de cada lote de sêmen, aproximadamente $2,1 \times 10^6$ células, para compor os grupos de sêmen sexado, que tiveram suas proporções alteradas resultando em sexado de macho (Y) ou sexado de fêmea (X).

No processo de sexagem aplicado rotineiramente no laboratório de produção, a confirmação da separação dos espermatozóides portadores de cromossomos X e Y é realizada através de uma análise no próprio citômetro em que se realizaram as sexagens, chamada de pureza, essa é feita utilizando uma palheta de cada lote, ou seja, retiram-se 250 µl (volume da palheta) e adiciona-se Hoechst 33342, após a amostra é colocada no sonicador para rompimento da cauda deixando a cabeça do espermatozóide livre para tornar a leitura do citômetro mais eficaz. Dessa maneira cada amostra coletada teve sua análise de pureza utilizando o citômetro para posterior análise comparativa com os resultados obtidos pela reação de PCR em tempo real.

4.2 Extração do DNA

Na extração do DNA utilizou-se o DTT (di-etiltreitol) para redução de pontes dissulfeto, e isotiocianato de guanidina para precipitação das proteínas. Em cada

amostra de sêmen (aproximadamente 250 µl) foi adicionado 500 µl de tampão de lise (5mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 + 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 + 5 mL de SDS 10% = 100 mL q.s.p) contendo 3 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 24 µl de DTT (1,2 M), após incubação à 55°C por 2 horas foi acrescentado 300 mL de solução de precipitação de proteínas (Isotiocianato de Guanidina 4 M e TRIS 0,1 M). Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de etanol 70% para lavagem do sedimento, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 40 µl de água ultra-pura e resuspendeu o sedimento mediante incubação à 55°C durante 30 minutos. O DNA foi armazenado em congelador a -20°C até o momento das análises em PCR em tempo real.

A quantificação do DNA foi feita pela mensuração da absorbância da luz ultravioleta em 260 nm, utilizando biofotômetro da Eppendorf®. Sua qualidade foi verificada através da razão das absorbâncias 260 nm e 280 nm, pois as proteínas são medidas em 280 nm, assim a proporção considerada ideal é de 1,8.

4.3 Primers e sondas

Foram utilizados os primers e sondas X e Y específicos de acordo com PARATI, et al. (2006), de regiões dos genes PLP e SRY, respectivamente, Figura 5. Sendo que para a sonda foi usado somente um tipo de fluoróforo (FAM) para não introduzir variantes e, portanto, as reações foram feitas separadamente.

Anteriormente ao início da parte experimental os primers para as regiões gênicas do SRY e PLP foram analisados, pesquisando as sequências genéticas no GenBank (AB039748 e AJ009913, respectivamente) e utilizando ferramenta do Blast para confirmação da especificidade dos mesmos aos cromossomos Y e X, respectivamente.

(a) Primers PLP	
	F 5'-GTTGTGTTAGTTTCTGCTGTACAATAAAGTG- 3'
	R 3'-TCCTACCCTCACCTGCCATC-5'
(b) Primers SRY	
	F 5'-CCACGTCAAGCGACCCAT-3'
	R 3'-CGAAGACGAAAGGTGGCTCT-5'
(c) Sonda X	
	5'-TGTATACACATAGCCCCTCCCTCTTGGACC-3'
(d) Sonda Y	
	5'-AACGCCTTCATTGTGTGGTCTCGTGA-3'

Figura 5. Primers e sondas X e Y específicos.

A amplificação do produto X resultou em um fragmento de 96 pb. Já o par de primers Y específico resultou num produto amplificado de 66 pb. Os produtos amplificados foram analisados e confirmados, após a PCR em tempo real, através da detecção de bandas, coradas com brometo de etídeo, em eletroforese em gel de agarose 2%. Com esse teste foi possível analisar a especificidade dos conjuntos de primer X e Y específicos para as duas subespécies utilizadas (*B. primigenius taurus* e *B. primigenius indicus*), pois existem diferenças nas morfologias dos cromossomos Y entre elas, e no cromossomo X não é possível afirmar que eles possuam diferença em suas sequências, pois para o *B. primigenius indicus* não há acesso liberado.

A eficiência dos primers X e Y, dos genes alvos PLP e SRY, respectivamente, foram testadas após corrida em gel de agarose 8% de amostra de sêmen sexado de macho, portador, portanto, de cromossomos X e Y, amplificado em reação de PCR. Após a corrida as bandas específicas de X e Y foram extraídas, quantificadas e foram feitas diferentes diluições de, em ng: 12,5 / 25 / 50 / 100 / 200, em seguida foram utilizadas na reação de PCR para posterior análise da curva de regressão linear.

4.4 PCR-RT quantitativo

Inicialmente a análise de PCR em tempo real foi padronizada onde foram testadas as eficiências dos primers e sondas juntamente com a concentração do DNA (50ng e 100ng). O equipamento é capaz de monitorar as reações resultando em gráficos com as curvas de amplificação para cada amostra de DNA analisada de acordo com os alvos dos cromossomos X e Y, o modelo do equipamento utilizado pelo experimento foi Real Time PCR 7000 (Applied Biosystems®).

A reação de cada amostra foi feita em duplicata e em cada tubo foi adicionado 12,5 µl do master mix (conjunto de reagentes para atividade exonucleásica), 0,45 µl (900 nM) do primer senso e 0,45 µl (900 nM) do primer anti-senso, 1 µl da sonda (200 nM), 4 µl de DNA (~100 ng) e 25 µl de água ultra-pura. O ciclo do termociclador realizado foi:

1 ciclo → denaturação do DNA, 2 minutos (50°C) para alcançar 95°C e depois manter 95°C por 10 minutos;

40 ciclos → 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.5 Análise Estatística

O cálculo das porcentagens obtidas de espermatozóides portadores de cromossomos X e Y em cada amostra foram feitos conforme segue abaixo:

$$dCT = CT(x) - CT(y)$$

$$\%Y = 100 / (1 + (2^{-dCT}))$$

$$\%X = 100 - \%Y$$

Onde os dados CT(x) e CT(y) foram obtidos das médias de duas reações diferentes.

Os resultados obtidos das porcentagens de X e Y foram comparados mediante teste ANOVA, conforme procedimento do programa JMP (SAS) versão 5.1. Havendo efeito, foi realizado o teste de Tukey-Kramer para comparação de

médias, e para os resultados das amostras de sêmen não sexado foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para análise de sua distribuição.

As duplicatas que apresentaram variação maior que 0,5 C_T foram excluídas das análises estatísticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da pureza por citometria de fluxo

Após a coleta das amostras de diferentes partidas sexadas pela citometria de fluxo, foi feita a análise utilizando o citômetro para obter a taxa de porcentagem de espermatozóides portadores de cromossomo X ou Y. A Tabelas 1 apresenta os resultados de sexagem apurados pela análise da pureza por citômetro de fluxo.

Tabela 1. Porcentagem de cromossomos X presentes no sêmen sexado de fêmea e Y no sêmen sexado de macho avaliado mediante análise por citometria de fluxo.

Análise por citometria de fluxo	Sexado para fêmea - % X	Sexado para macho - % Y
Média	89,42	89,20
Mediana	89	89
Desvio padrão	1,89	2,04
n	21	21

As amostras obtiveram resultados satisfatórios quanto a sexagem pela citometria de fluxo, obteve apenas uma amostra de sexado de macho que apresentou 86% de espermatozóides portadores de cromossomos Y, toda a partida dessa referente amostra foi descartada visto que ela estava abaixo do limite inferior para a comercialização que é de 87%. Devido às diferentes variáveis que a técnica de citometria apresenta durante a sexagem, como a marcação do DNA pelo Hoechst 33342, a leitura do laser, a separação por diferença de cargas elétricas, velocidade e pressão de passagem no nozzle e o manuseio do operador do citômetro, as diferentes taxas de sexagem encontradas entre as amostras são resultados destas e assim diariamente são feitas adequações do protocolo para que resulte em valores cada vez mais homogêneos. De acordo com a revisão de Garner (2006) as variáveis presentes na técnica de sexagem devem e estão sofrendo constantemente otimizações afim de possibilitar em diferentes espécies a possibilidade de uma sexagem com maior qualidade resultando em melhores taxas de nascimento.

5.2 Extração de DNA

A média da concentração do ácido nucléico obtida a partir dos espermatozóides provenientes do sêmen não sexado foi de 160 ng/μL. Como as doses sexadas possuem uma concentração menor (aproximadamente 100 vezes) do que doses de sêmen convencional já era esperado um menor rendimento. A média obtida para as amostras de sêmen sexado X e Y foi de 40 ng/μL. Pode-se observar que não existiu efeito da concentração durante o processo de extração entre os materiais sexado de fêmea e sexado de macho, pois no processo de sexagem a concentração final é ajustada em 8×10^6 espermatozóides/ml para posterior envasamento.

A extração sem utilização de kits comerciais do presente estudo em comparação aos estudos que utilizaram como PARATI et al. (2006) e JOERG et al. (2004) demonstraram também ser eficiente assim como no trabalho realizado por CHANDLER et al. (1998) onde a extração de aproximadamente 1×10^6 células espermáticas utilizando hidróxido de potássio e DTT (Di-etiltreitol) obteve uma média de 30 ng/μL de DNA para utilização na reação de PCR.

5.3 Padronização das reações em PCR em tempo real.

De acordo com o relatado nos materiais e métodos a reação em PCR em tempo real foi padronizada e obteve-se a mesma eficiência dos primers e a concentração do DNA ideal na amostra. Foram feitos testes com 50 ng e 100 ng de DNA e os dois obtiveram curvas de amplificação característica como pode ser visualizado na Figura 6.

(A) **(B)**

Figura 6. **(A)** Sêmen sexado para fêmea: reação de PCR em tempo real para o gene PLP com diferentes concentrações de DNA, sendo 50 ng e 100 ng (curva verde). **(B)** Sêmen sexado para macho: reação de PCR em tempo real para o gene SRY com diferentes concentrações de DNA, sendo 50 ng e 100 ng (curva verde).

Através de uma análise descritiva pode-se observar que as concentrações de DNA tanto no sêmen sexado de fêmea como no sexado de macho são semelhantes quanto ao tempo de subida da curva e as duas apresentaram o mesmo tempo de amplificação alcançando juntas o platô. Desse modo as análises foram feitas com a maior concentração (100ng).

Após a amplificação foi feita a eletroforese em gel de agarose 2% com os produtos obtidos da reação, visualizando na Figura 7 pode-se verificar que o fragmento amplificado específico do gene PLP é maior, e próximo a 96bp descrito por Parati et al. (2006), do que o específico do gene SRY, 66bp (PARATI et al., 2006). As diferentes concentrações utilizadas de DNA (50ng e 100ng) resultaram no padrão de banda esperado.

Figura 7. Imagem da eletroforese, em gel de agarose 2%, dos produtos amplificados em duplicata pela técnica de PCR em tempo real. Primeira coluna solução padrão de 100 pares de base. Gene X são os produtos oriundos da seqüência X específica do gene PLP e para o Gene Y, os produtos são cópias da seqüência Y específica do gene SRY. Amostras estão em duplicatas e testadas em duas concentrações de DNA (50 e 100ng).

Foram analisadas as regressões lineares obtidas das amplificações de diferentes diluições (12,5/25/50/100/200 em ng) do produto extraído das bandas de corrida em gel de agarose 8% de amostra teste XY. Tanto o conjunto de primers X do gene PLP quanto o Y, gene SRY, apresentaram-se eficientes (Figura 8).

As curvas X e Y obtiveram um R^2 de 0,93 e 0,94, respectivamente, e as inclinações foram de -3,39 e -3,27, para X e Y resultando em uma diferença de apenas 0,12 Ct. A avaliação da taxa de amplificação resultou em uma eficiência de 99 e 98%, respectivamente.

Figura 8. Regressão linear do resultado das amplificações do primer Y (▪ superior) e do primer X (● inferior).

5.4 Análises em PCR em tempo real.

Foram utilizadas 21 amostras de sêmen sexado X, 21 amostras de sêmen sexado Y e para cada uma foi feito o controle com o sêmen não sexado, para a identificação e consequente confirmação mediante PCR em tempo real da taxa de sexagem obtida pela técnica de citometria de fluxo. Em cada uma das amostras de DNA extraídas do sêmen sexado eram feitas análises para o gene X e para o gene Y em duplicatas.

Como eram esperadas, as curvas de amplificação das amostras provenientes do sêmen não sexado dos genes alvo dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) apresentaram-se iguais demonstrando que a proporção existente é a mesma, ou seja, aproximadamente 50/50. Já nas amostras de sêmen sexado as curvas de amplificação diferiram no número de ciclos em relação à quantidade logarítmica de fluorescência emitida, ilustrando então uma diferença nas quantidades presentes do cromossomo sexual pré-determinado (Figura 9).

(a)

(b)

Figura 9. **(a)** Exemplo da curva de amplificação (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) da amostra de sêmen não sexado, como apresentam a mesma proporção de cromossomos X e Y apresentam a curva praticamente ao mesmo tempo. **(b)** curva de amplificação (em logaritmo da fluorescência) dos genes alvos dos cromossomos X (PLP) e Y (SRY) no sêmen sexado de fêmea, as duplicatas superiores referem-se as cópias das sequências do gene PLP e as inferiores do SRY.

Pode-se observar que as porcentagens de espermatozóides portadores de cromossomos X e Y provenientes do sêmen não sexado aproximou-se da razão esperada de 1:1, sendo a média de 51,82% e mediana de 51,42%. A distribuição da frequência dos cromossomos em espermatozóides não sexados ficou dentro da curva de normalidade, teste de normalidade Shapiro-Wilk, com $p < 0,6393$ (Figura 10).

Figura 10. Distribuição da frequência dos cromossomos sexuais presentes no DNA extraído de amostras de sêmen não sexado analisadas pela técnica de PCR em tempo real e seus valores estatísticos.

O grupo controle composto pelo sêmen não sexado obteve o resultado esperado da proporção de espermatozóides portadores de cromossomos X e Y de, aproximadamente, 50/50 na técnica de PCR em tempo real, validando assim a

técnica utilizada. Sabe-se que um desvio nessa proporção é naturalmente encontrado, de acordo com a revisão de HARDY (1997) ele propõe dois tipos de fatores: os envolvidos com questões evolucionários e os fatores empíricos, todos resultando em desvios não constantes na proporção sexual esperada de 1:1. CHANDLER et al. (1998), estudaram bovinos da raça Holandesa e suínos, e não observaram uma constante no desvio da proporção de espermatozóides portadores de cromossomo X e Y dentre os ejaculados de uma mesmo indivíduo. Porém, numa pesquisa mais recente CHANDLER et al. (2002) elucidam que a variação das proporções sexuais entre os portadores de cromossomos X e Y encontradas no ejaculado podem ser alteradas de acordo com os intervalos de sucessivas ejaculações assim como também alterar a qualidade do sêmen, no entanto mais pesquisas devem ser feitas para demonstrar os mecanismos que causam a variação na porcentagem existente de espermatozóides portadores do cromossomo Y na natureza e determinar uma possível constante.

Nas amostras de sêmen sexado de macho pela técnica de PCR em tempo real obteve-se uma maior concentração dos espermatozóides portadores de cromossomos Y, acima de 89,2%, validando a técnica de sexagem de macho pela citometria já que ela é feita com o objetivo de obterem-se populações acima de 87% do sexo desejado.

Observou-se, no entanto, uma variação substancial dos resultados nas amostras de sêmen sexado para fêmea (Figuras 11), aproximadamente 13% da avaliação pela citometria (pureza) e pela PCR em tempo real que são indicativos de uma fonte possível de variação, na média, valores menores ao encontrado pela confirmação da taxa de sexagem por citometria de fluxo.

Figura 11. Distribuição da porcentagem de cromossomos X provenientes do DNA extraído de espermatozoides das amostras de sêmen sexado de Fêmea em comparação com o tipo de confirmação de sexagem: (a) Citometria de fluxo e (b) PCR em tempo real.

A variação encontrada entre os testes de confirmação, re-análise pela citometria e PCR em tempo real, pode advir de um problema de acurácia nas análises do PCR ou da citometria. Porém, esta divergência não ocorre com o sêmen sexado para Macho (Figura 12).

Figura 12. Distribuição da porcentagem de cromossomos Y provenientes do DNA extraído de espermatozoides das amostras de sêmen sexado de Macho em comparação com o tipo de confirmação de sexagem: (a) Citometria de fluxo e (b) PCR em tempo real.

No estudo de JOERG et al. (2004) feito para validar o sêmen sexado foi utilizado outra sequência gênica o MSHR, ao invés do PLP, para desenhar os primers, e eles obtiveram resultados semelhantes, ou seja, taxas menores do que a análise feita por citometria de fluxo. Já PARATI et al. (2006) e Puglisi et al. (2006), utilizando o mesmo conjunto de primers X e Y específico e sondas TaqMan® do

presente trabalho, não encontraram variações para a confirmação da taxa de sexagem por citometria de fluxo utilizando a técnica de PCR em tempo real. O que nos leva a discutir o tipo de extração, ou seja, no trabalho de Parati et al. (2002), a extração com utilização de Kit comerciais resulta num DNA mais puro, tornando mais eficaz a técnica de PCR em tempo real, já a extração utilizada no presente trabalho, apesar de ser menos onerosa, não permitiu total retirada das proteínas, e essas podem ter influenciado na eficiência da reação de PCR em tempo real.

O presente trabalho também analisou as diferentes taxas de sexagem dentro de quatro raças, sendo duas européias (Holandês e Red Angus) e duas zebuínas (Nelore e Gir Leiteiro). As médias encontradas no mesmo indivíduo nas diferentes técnicas de confirmação da taxa de sexagem encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Análise dos diferentes touros com ejaculados coletados para sexagem em relação às duas diferentes técnicas de confirmação da taxa de sexagem: pureza (re-análise em citômetro) e PCR em tempo real.

Touro	Raça	Sexo	n (citometria)	%média (citometria)	n (PCR tempo real)	% média (PCR tempo real)
T9	Gir Leiteiro	Fêmea	1	89	2	80,9
T3	Holandês	Fêmea	4	88,5	8	86,6
T1	Holandês	Fêmea	2	89,5	4	83,6
T15	Nelore	Macho	1	93	2	95,1
T12	Nelore	Macho	2	90	4	85,4
T16	Red Angus	Macho	6	88,6	12	91,7
T5	Nelore	Macho	1	91	2	84,8

As técnicas de citometria (pureza) e PCR em tempo real apresentaram uma variação tanto para sêmen sexados de fêmea como para os machos sem que um efeito individual fosse observado.

Para análise da variância das raças agrupou-se os touros provenientes da mesma e foi verificado que pela confirmação da taxa de sexagem através da própria citometria (pureza) não houve diferença estatística entre as raças, $\alpha=5\%$ (Tabela 3). Já para a confirmação através da técnica de PCR em tempo real houve diferença estatística entre os grupos de raças leiteiras Gir Leiteiro/Holandês e de corte Nelore/Red Angus, sendo que as duas raças Nelore e Red Angus apresentaram uma maior taxa de gametas sexados.

Tabela 3. Comparativo entre os grupos de raças em relação às técnicas de re-análise: citometria de fluxo e PCR em tempo real, para confirmação da taxa de sexagem.

Raças dos touros	% do sexo selecionado citometria de fluxo	% do sexo selecionado PCR tempo real
Gir Leiteiro	89,54 $\pm$ 0,53 ^a	71,88 $\pm$ 3,34 ^a
Holandês	88,80 $\pm$ 0,56 ^a	75,89 $\pm$ 3,09 ^a
Nelore	90,87 $\pm$ 0,63 ^a	86,62 $\pm$ 4,09 ^b
Angus (Aberdeen e Red)	88,66 $\pm$ 0,72 ^a	91,76 $\pm$ 3,09 ^b

“a,b,c” – Letras diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam que os dados diferem entre si ($p < 0,05$).

Entretanto, é importante lembrar que a sexagem dos animais para as raças de corte foi com objetivo do cromossomo Y enquanto os das raças leiteiras foram visando o cromossomo X, podendo, portanto ter efeito do sexo, pois o processo de sexagem por citometria é feito com mais cuidados em relação à velocidade de passagem dos espermatozóides no citômetro quando sexado de macho, pois o cromossomo Y por ser menor apresenta menor fluorescência em relação ao cromossomo X quando corados pelo Hoescht 33342. Como na técnica de PCR em tempo real a eficiência dos dois conjuntos de primers X e Y específicos foram as mesmas, os resultados sugerem uma superestimação da frequência de X pelo teste de citometria de fluxo (pureza). Em pesquisas anteriores para confirmação da taxa de sexagem realizada por citometria de fluxo (SEIDEL JR. et al, 2004; PARATI et al., 2006; JOERG et al.,2004) não houveram análises comparativas entre os dois tipos de sêmen sexado (macho e fêmea).

Ao analisar a média da variância dos resultados da técnica de PCR em tempo real agrupando pelos sexos pré-determinados pela citometria de fluxo, pode-se concluir, utilizando o teste Tukey-Kramer que houve diferença estatística, ao nível $\alpha = 0,0335\%$.

Como discutido anteriormente, devido à técnica de citometria ser feita baseada no conteúdo espermático e também ter variações do operador, conclui-se que a separação dos espermatozóides portadores de cromossomos X e Y apresenta uma variação na seleção dos gametas dependente do sexo desejado. Era esperado que houvesse uma diferença entre as raças, já que elas possuem

diferentes proporções de conteúdo espermático entre X e Y, mas essa não foi encontrada, possivelmente por o citômetro ser alinhado para cada animal no momento que se inicia a sexagem. Estes resultados corroboram com estudos independentes que mostram uma taxa semelhante de sexagem entre touros de diferentes raças incluindo os B. indicus (Gir), Mellado et al. (2010) em estudo da fertilidade de vacas e novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado para fêmea de touros Gir em ambiente subtropical, obteve resultado satisfatório da proporção sexual obtida, o sêmen sexado resultou em 91% de nascimentos de fêmeas.

O mesmo teste também foi feito para re-análise das amostras sexadas em citometria de fluxo ("pureza"), e o resultado neste caso não difere estatisticamente entre o sêmen sexado de fêmea e o sexado de macho, com $\alpha=0,2661\%$.

A avaliação de pureza mediante re-análise em citometria de fluxo não apresentou variações entre os grupos de sexo, apesar do maior tempo demandado para se separar espermatozóides portadores de cromossomo Y ($P=0,26$). Este dado indica, do ponto de vista da pureza avaliada pelo re-análise, que os cuidados tomados no momento da seleção do sêmen sexado para macho são suficientes para atingir resultados semelhantes aos sexados para fêmea.

A porcentagem dita presente nas palhetas sexadas de cada partida através da confirmação pela citometria de fluxo é validada com alta acurácia por estudos após o nascimento dos animais provenientes de inseminação artificial com sêmen sexado. Borchersen e Peacock (2009) em estudo de dados de rebanhos leiteiros nos Estados Unidos confirmaram a taxa de sexagem através da citometria de fluxo, resultando em, aproximadamente, 90% de nascimentos de fêmeas sem interferência das raças analisadas.

Devido a maior parte dos estudos serem feitos com animais da sub-espécie européia o presente trabalho visou analisar a sub-espécie zebuína, já que nos países tropicais elas representam a maior parte dos rebanhos, porém não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre as raças. O estudo de Mellado, et al. (2010) obteve resultado similar do presente trabalho, não encontrando diferença ao analisar a utilização de sêmen sexado de touros Gir, obtendo a proporção sexual na progênie de 91% de nascimentos de fêmeas.

Apesar disto, no presente estudo, encontrou-se uma variação entre a porcentagem de cromossomos X encontrada em sêmen sexado para fêmea

avaliada pelo teste de pureza e pela PCR em tempo real. Esta variação pode estar relacionada com os espermatozóides não viáveis ou até fragmentos de DNA, já que eles não são levados em consideração na avaliação por citometria de fluxo. Esta característica poderia justificar as diferenças observadas neste estudo e no de JOERG, et al. (2004) e ao mesmo tempo as taxas de sexagem eficientemente comprovadas pelos nascimentos (MELLADO, et al., 2010; BORCHERSEN & PEACOCK, 2009).

6. CONCLUSÕES

- A utilização do di-etitreitol (DTT) e do isotiocianto de Guanidina com objetivo de melhorar o desempenho da extração de DNA sem a necessidade de utilizar kits comerciais, permitiu recuperar DNA em quantidade suficiente para análise em PCR tempo real.
- O teste de sexagem, mediante aplicação da técnica de PCR em tempo real permitiu, estimar a proporção de cromossomos X e Y em uma amostra de DNA extraído de sêmen.
- Os conjuntos de primers X-específico e Y-específico, para os genes PLP e SRY, respectivamente, funcionaram efetivamente nas duas sub-espécies estudadas (*B. primigenius taurus* e *B. primigenius indicus*).
- A sexagem por PCR em tempo real também permitiu avaliar o desvio da proporção dos cromossomos X e Y em amostras de sêmen sexados confirmados mediante re análise por citometria de fluxo.
- Uma diferença nas estimativas de proporção do cromossomo X foi observada em amostras sexadas para fêmea. Apesar deste resultado, uma variação obtida durante a análise requer que estes resultado sejam confirmados por outros estudos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização da técnica de PCR em tempo real é possível de ser aplicada na produção comercial do sêmen sexado.
- A variação encontrada na confirmação da sexagem do sêmen sexado para fêmea entre as técnicas pode estar relacionada com os espermatozóides não viáveis ou até fragmentos de DNA.

- O aprimoramento constante da técnica de PCR em tempo real, permitirá melhores resultados de sexagem através dessa técnica dando suporte à sexagem por citometria de fluxo.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIM, G.; SCHNELL, S. **Genetic impacts of using female sorted semen in commercial and nucleus herds**. Journal of Dairy Science, v.90, p.1554-1563, 2007.

ALBERTS, B et al. **Biologia molecular da célula**. [Molecular biology of the cell]. Tradução de: Ana Letícia de Souza Vanz et al. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p., 1 CD-ROM.

ANDERSSON, M. et al. **Effect of insemination with doses of or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows**. Theriogenology, Stonehan, v. 61, p. 1583-1588, 2004.

ARNHEIM, N.; ERLICH, H. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, v.61, p.131-156, 1992.

ARRUDA, R. P. et al. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF**. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2006, Londrina. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, v. 1. p. 157-164, 2007.

ASBIA, **Relatório de comercialização de sêmen do ano de 2010**. Associação Brasileira de Inseminação Artificial - ASBIA disponível em <http://www.asbia.org.br/> , consultado em 20/07/2011.

ASBIA, 2007. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Disponível em <http://www.asbia.org.br/> consultado em 03/07/2011.

BARUSELLI, P.S. et al. **Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 31, p. 374-381, 2007.

BEKMAN, H.; MEUWISSEN, T.H.E.; OLDENBROEK, J.K. **Increasing beef production from dairy cows by implanting embryos from MOET nucleus**

breeding schemes for beef cattle. *Livestock Production Science*, v.37, p.271-282, 1994.

BLECHER, S.R. et al. **A new approach to immunological sexing sperm.** *Theriogenology*, v.52, p.1309-1322, 1999.

BENGTSSON, M. et al. **A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR.** *Nucleic Acids Research*, v.31, 2003.

BLOTTNER, S. et al. **Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll density gradient.** *Archiv Tierzucht*, v.36, n.2, p.153-162, 1993.

BODMER, M. et al. **Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions.** *Theriogenology*, Stoneham, v. 64, p. 1647-1655, 2005.

BORCHERSEN, S.; PEACOCK, M. **Danish A.I. field data with sexed semen.** *Theriogenology*, v.71, p.59-63, 2009.

BREDBACKA, P.; KANKAANPAA, A.; PEIPPO, J. **PCR-sexing of bovine-embryos: a simplified protocol.** *Theriogenology*, v.44, p.167-176, 1995.

CAPLIN, B.E. et al. **LightCycler™ hybridization probes- the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection.** *Biochemica*, v.1, p.5-8, 1999.

CHANDLER, J.E. et al. **Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates.** *Theriogenology*, v.57, p.1327-1346, 2002.

CHANDLER, J.E. et al. **Bovine spermatozoa head size variation and evaluation of a separation technique based on this size.** *Theriogenology*, v.52, n.6, p.1021-1034, 1999.

CHANDLER, J.E. et al. **Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving and farrowing records.** *Journal of Dairy Science*, v.81, p.1855-1867, 1998.

CLUTTON-BROCK, T.H.; IASON, G.R. **Sex ratio variation in mammals.** *The Quarterly Review of Biology*, v.61, p.339-374, 1986.

CURRAN, S.; GINTHER, O.J. **Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions.** Theriogenology, v.36, p.809-814, 1991.

DELL'AQUA JR., J.A. et al. **Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões.** Acta Scientiae Veterinariae, v.34 (suplemento), Porto Alegre:UFRGS, p.205-212, 2006.

DERMATAWEWA, C.M.B.; BERGER, P.J. **Effect of dystocia on yield, fertility and cow losses and an economic evaluation of dystocia scores of Holsteins.** Journal of Dairy Science, v.80, p.754-761, 1998.

ELSIK, C.G.; TELLAM, R.L.; WORLEY, K.C. **The Genome Sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology an evolution.** Science, v.324, p.522-528, 2009.

GARNER, D.L. **Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm.** Theriogenology, v.71, n.1, p.11-21, 2009.

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

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

GARNER, D.L. et al. **Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry.** Biology of Reproduction, v.28, p.312-321, 1983.

GRAAF, S.P. et al. **Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule.** Theriogenology, v.71, p.89-97, 2009.

GRAVES, J.A.M. **Weird animal genomes and the evolution of the vertebrate sex and sex chromosome.** Annual Review of Genetics, v.42, p.565-586, 2008.

HABERMANN, F.A. et al. **Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual color fluorescence in situ hybridization.** Journal of Animal Breeding Genetics. Supplement 1, p.22-27, 2005.

HARDY, I.C.M. **Possible factors influencing vertebrate sex ratio: an introductory overview.** Applied Animal Behaviour Science, v.51, p.217-241, 1997

HENDRIKSEN, P.J.M. **Do X and Y spermatozoa differ in proteins?** Theriogenology, v.52, p.1295-1308, 1999.

HIGUCHI, R. et al. **Simultaneous amplification and detection os specific DNA-sequences.** Bio-Technology, v.10, p.413-417, 1992.

HOHENBOKEN, W.D. **Applications of sexed semen in cattle production.** Theriogenology, v.52, p.1421-1433, 1999.

HOLLAND, P.M. et al. **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** Proc. Natl. Acad. Sci., v.16, p.7276-7280, 1991.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade.** (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. et al. **Separation of X- and Y- bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation.** *Theriogenology*, v.53, n.1, 2000.

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

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. **Controle de qualidade na seleção de espermatozóides de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica coloidal modificada (Percoll®) e iodaxanol (OptiPrep™).** (Tese Livre-docência) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal, 2005.

JAFAR, S.I.; FLINT, A.P. **Sex selection in mammals: a review.** Theriogenology, v.46, p.191-200, 1996.

JOERG, H. et al. **Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR.** Journal of Animal Breeding and Genetics, v.121, p.209-215, 2004.

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

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

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

JOHNSON, L.A.; CRAN, D.G.; 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, n.1, p.51-56, 1994.

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V. **Flow cytometry of X- and Y-chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342.** Gamete Research, v.17, p.203-212, 1987.

KANEKO, S.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. **Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation.** Fertility and Sterility, v.40, n.5, p.661-665, 1983.

KUBISTA, M. et al. **The real-time polymerase chain reaction.** Molecular Aspects of Medicine, v.27, p.95-125, 2006.

KUBISTA, M.; STAHLBERG, A.; BAR, T. **Light-up probe based real-time Q-PCR.** Genomics and Proteomics Technologies, p.53-58, 2001.

KURYKIN, J. et al. **Pregnancy percentage following deposition of sex sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers.** *Theriogenology*, Stonehan, v. 67, p. 754-759, 2007.

LONERGAN, P. et al. **Effect of the in vitro culture system on the kinetics of development and sex ratio of bovine blastocysts.** Theriogenology, v.55, p.430, 2001.

LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. **In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm.** Theriogenology, v.52, p.1393-1405, 1999.

MAXWELL, W.M.C. et al. **Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox.** *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.79-95, 2004.

MARGARIT, E. et al. **Identification of conserved potentially regulatory sequences of the SRY gene from 10 different species of mammals.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.245, p.370-377, 1998.

MELLADO, M.; CORONEL, F.; ESTRADA, A.; RIOS, F.G. **Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen.** *Tropical Animal Health Production*, v.42, p.1493-1496, 2010.

MOLES, A.; RIZZI, R.; DÁMATO, F.R. **The number of males pups within a litter of NMRI mice associated with dams food preferences late in pregnancy.** *Psychoneuroendocrinology*, v.28, p.250-260, 2003.

OTTO, F.J. et al. **Flow cytometry of human spermatozoa.** *Histochemistry*, v.62, p.249-254, 1979.

O'BREIN, J.K. et al. **Sex ratio modification using sperm sorting and assisted reproductive technology – a population management strategy.** In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on Assisted Reproductive Technology for the Conservation and Genetic Management of Wildlife*, p. 224-231, 2002.

PARATI, K.; BONGIONI, G.; ALEANDRI, R.; GALLI, A. **Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR.** *Theriogenology*, v.66, p.2202-2209, 2006

PINKEL, D. et al. **High resolution DNA content measurements of mammalian sperm.** *Cytometry*, v.3, p.1-9, 1982.

PUGLISI, R. et al. **In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR.** *Reproduction*, v.132, p.519-526, 2006.

RATH, D.; MOENCH-TEGEDER, G.; TAYLOR, U.; JOHNSON, L.A. **Improved quality of sex sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application.** *Theriogenology*, v.71, p.22-29, 2009.

RENS, W. et al. **An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures.** *Reproduction*, v.121, p.541–546, 2001.

REUBINOFF, B.E.; SCHENKER, J.G. **New advances in sex pre selection.** Fertility and Sterility, v.68, p.380-381, 1996.

RUTLEDGE, R.G.; COTE, C. **Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves.** Nucleic Acids Research, v.31, 2003.

RUUVUNA, F. et al. **Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls.** Journal of Animal Science, v.70, p.1091-97, 1992.

SANG, L. et al. **An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm.** Journal of Dairy Science, v.94, p.2060-2070, 2011.

SCHENKER, J.G. **Gender Selection: Cultural and Religious Perspectives.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v.19, p.400-410, 2002.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. **Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa.** Theriogenology, Stonehan, v. 52, p. 1375-11391, 1999.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. **Embryo production from superovulated cattle following insemination of heifers with sexed sperm.** Theriogenology, Stonehan, v. 65, p. 299-307, 2006.

SEIDEL Jr, G.E. **Economics of selecting for sex : the most important genetic trait.** Theriogenology, v.59, p.585-598, 2003.

SEIDEL Jr., G.E.; GARNER, D.L. **Sexing mammalian sperm by flow cytometry.** Reproduction, v.124, p.733-743, 2002.

SEIDEL Jr, G.E. et al. **Insemination of heifers with sexed sperm.** Theriogenology, v.52, p.1407-1420, 1999.

SHASTRY, P.R.; HEGDE, U.C.; RAO, S.S. **Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y- bearing spermatozoa.** Nature, v.269, p.58-60, 1977.

STILL, E.S.; KIRMAN, I.; THATCHER III, S.S.; PALERMO, G.P. **Sex-selection of human spermatozoa: evolution of current techniques and applications.** Archives of Gynecology and Obstetrics, v.261, p.109-115, 1998.

SUH T.K., SCHENK J.L. **Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw mobility characteristics.** Theriogenology, v.59, 2003 (resumo).

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

THIBIER, M. **The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives.** Reproduction, Nutrition, Development, v.45, p.235-242, 2005.

VAN KOOIJ, R.J.; VAN OOST, B.A. **Determination of sex ratio of spermatozoa with deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison.** Fertility and Sterility, v.58, p.384-386, 1992.

VAN VLECK, L.D. **Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle.** New technologies in animal breeding, p.222-42, 1981.

VAN VLECK, L.D.; EVERETT, R.W. **Genetic value of sexed semen to produce dairy heifers.** Journal of Dairy Science, v.59, p.1802-1807, 1976.

WATERS, P.D.; WALLIS, M.C.; MARSHALL GRAVES, J.A. **Mammalian sex – Origin and evolution of the Y chromosome and SRY.** Cell & Developmental Biology, v.18, p.389-400, 2007.

WEIGEL, K.A. **Exploring the rule of sexed semen in dairy production systems.** Journal of Dairy Science, v.87, p.E120-E130, 2004. Supplement.

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, v.52, p.1343-1352, 1999.

WHEELER, M.B. et al. **Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle.** Theriogenology, v.65, p.219-227, 2006.

WIGHT, P.A.; DOBRETSOVA, A. **Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression.** Cell Mol Life Sci, v.61, p.810-821, 2004.

WILLARD, H.F.; RIORDAN, J.R. **Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders.** Science, v.230, p.940-942, 1985.

WINDSOR, D.P.; EVANS, G.; WHITE, I.G. **Sex predetermination by separation of X- and Y- chromosome bearing sperm: a review.** Molecular Reproduction and Development, v.5, p.155-171, 1993.

WITTER, C.T.; HERRMANN, M.G.; GUNDRY, C.N.; Elenitoba-Johnson, K.S. **Real-time multiplex PCR assays.** Methods, v.25, p.430-442, 2001.

YOOL, D. A.; EDGAR, J. M.; MONTAGUE, P.; MALCOLM S. **The proteolipid protein gene and myelin disorders in man and animals models.** Human Molecular Genetics, v.9, p.987-992, 2000.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. **Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.** Nucleic Acids Research, v.32, 2004.