

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**USO DE APTÂMEROS NA SEXAGEM  
DE SÊMEN BOVINO**

**José Eduardo de Oliveira Zanon**  
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**USO DE APTÂMEROS NA SEXAGEM  
DE SÊMEN BOVINO**

**Doutorando: José Eduardo de Oliveira Zanon  
Orientador: Prof. Adj. Luiz Claudio Nogueira Mendes  
Co-Orientador: Dr. Sergio Moraes Aoki**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP  
2016

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

Zanon, José Eduardo de Oliveira.

Z171u      Uso de aptâmeros na sexagem de sêmen bovino / José  
Eduardo de Oliveira. - Araçatuba, 2016.  
63 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Orientador: Prof. Adj. Luiz Cláudio Nogueira Mendes  
Co-orientador: Dr. Sergio Moraes Aoki

1. Aptâmeros de Nucleotídeos 2. Bovinos 3. Espermatozoides  
4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
5. Pré-Seleção do Sexo. I. T.

CDD 617.63

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Uso de aptâmeros na sexagem de sêmen bovino

---


---


---

**AUTOR: JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA ZANON**


**ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Dra. FLAVIA LOMBARDI LOPES  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Profa. Dra. MARIA DENISE LOPES  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

  
Prof. Dr. EDUARDO HARRY BIRGEL JUNIOR  
Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga - USP

Araçatuba, 27 de janeiro de 2016.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA ZANON** – Nascido em 20 de novembro de 1979, na cidade de Araçatuba – SP, ingressou no antigo Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, hoje Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araçatuba em fevereiro de 1997, se formando em dezembro de 2001. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica, sob orientação do Prof. José Fernando Garcia, de junho de 1998 a maio de 2001, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal. Em fevereiro de 2003, iniciou Mestrado pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP, obtendo o título de Mestre em Reprodução Animal em fevereiro de 2006, com dissertação intitulada “Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)”, sob orientação do Prof. Alicio Martins Júnior e, durante o período, foi bolsista pela Fapesp. Antes mesmo do final do mestrado, já trabalhava como chefe de laboratório de produção de embriões bovinos *in vitro*, na empresa Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal Ltda., e foi responsável por laboratórios nas cidades de São José do Rio Preto – SP, Cartagena de Índias – COL e Cuiabá – MT, no período de agosto de 2005 a março de 2012. Ingressou no programa de Doutorado em Ciência Animal, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, em agosto de 2012, sob orientação do Prof. Luiz Claudio Nogueira Mendes e co-orientação do Dr. Sergio M. Aoki. Durante o período do Doutorado, prestou serviços como Bolsista CNPQ na empresa DNApta Biotecnologia, em São José do Rio Preto – SP, durante o período de outubro de 2013 a novembro de 2014. Atualmente é bolsista CAPES do programa de pós-graduação desde dezembro de 2014.

*“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas sim a ilusão da verdade”*

*Stephen Hawking*

*“Então, quando eu olho para o céu à noite, eu sei que sim, somos parte deste Universo,  
estamos neste Universo. Mas talvez, mais importante que esses dois fatos, é que o*

*Universo está em nós”*

*Neil DeGrasse Tyson*

*Dedicado à minha esposa, Aline, e aos meus pais.*

*Sem eles, sem chance.*

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Aline, por ter segurado essa barra que foi o começo do meu doutorado e do nosso casamento, fazendo minha vida mais feliz, e dizer que sem ela, eu não teria voltado para Araçatuba e muito menos teria suportado todas as dificuldades que enfrentamos junto por esse período. Te amo!

Aos meus pais, Seu Zé e Dona Ana, por todo o incentivo, suporte e amor ao longo de toda essa carreira acadêmica, que começou faz um bom tempo.

Ao meu irmão Pedro, pela amizade ao longo de toda essa vida e por não ter desistido das suas próprias lutas individuais, bem mais difíceis que as minhas.

Aos meus familiares e amigos, por entenderem ou não o que eu estava fazendo esse tempo todo, ou por acharem que eu só estava “estudando”.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Claudio Mendes, que antes de ser meu orientador sempre foi meu amigo, e hoje é muito mais do que isso, serei muito eternamente grato por ter feito muito mais do que precisava fazer.

À Prof. Juliana Peiró, pelo apoio quando mais era necessário e por ceder gentilmente seu laboratório para que os experimentos fossem realizados.

À doutoranda Priscila Dalmagro, que desde os tempos na DNApta, e depois nos tempos de LEEGA, tem mostrado uma amizade e um valor inestimável.

Aos amigos do grupo “Cavalo Atleta”, Arthur Araújo, Mariana Jeronymo, João Pedro Barbosa, Rafaela Baptista e Daniela Denadai, pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos residentes Eduardo Panelli, Guilherme Alves, Natalia Rahal, Lilian Utraga e Kayo Neto pela ajuda nas coletas, pelas risadas e pela amizade durante o estágio de docência.

Aos professores Francisco Leydson Feitosa, Fernanda Bovino e Fabiano Cadioli, pela oportunidade que tive de aprender tudo de novo na disciplina de Clínica Médica de Grandes Animais durante o estágio de docência, e à pós-doutoranda Lina Gomide pelo trabalho com os cavalos.



Aos amigos Sergio Aoki, Paulo Peitl Jr. e Rodrigo Lovato, e a todos funcionários da DNApta Biotecnologia, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela amizade durante o tempo em que pudemos trabalhar juntos.

Aos professores Marcelo Meirelles, Valéria Lima e Flávia Lopes, por emprestarem seus laboratórios e equipamentos para as reações ao longo de quase dois anos.

À professora Silvia Perri pelas dicas nas análises estatísticas e à professora Flávia Lopes por realizar estas análises.

Aos pós-graduando Milena Sato e Alex Nakamura pelo suporte no início dos experimentos no laboratório do Prof. Marcelo Meireles.

Ao amigo Gustavo Avelar por ter ajudado quando necessário, sem ter obrigação nenhuma, mais de uma vez.

Aos amigos do LEEGA, por toda amizade durante nossa convivência.

Aos demais pós-graduandos, professores da pós-graduação e funcionários da FMVA, pelo tempo que dividimos juntos na faculdade.

Aos alunos de 4º ano da XXIII turma da FMVA, pelos bons momentos compartilhados durante o estágio de docência.

Às funcionárias da biblioteca, Fátima Bertolucci e Isabel Matos pelo auxílio nas consultas e pesquisas bibliográficas.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e aos funcionários do setor de Pós-graduação desta unidade pelo suporte.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado do programa de pós-graduação.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA – Unesp, pela oportunidade de se realizar mais esta etapa da minha vida acadêmica, ela que já começou há quase 20 anos nesta mesma faculdade.

A você que está lendo isso, também, muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
1.1 Introdução e Revisão de Literatura .....	13
1.2 Referências .....	29
CAPÍTULO 2 – USO DE APTÂMEROS NA SEXAGEM DE SÊMEN	
BOVINO .....	35
2.1 Introdução .....	36
2.2 Material e Métodos .....	39
2.2.1 Produção e seleção dos aptâmeros .....	39
2.2.2 Preparação do sêmen .....	40
2.2.3 Separação magnética do sêmen pelo sexo .....	41
2.2.4 Extração e quantificação do DNA .....	42
2.2.5 Desenho dos primers .....	43
2.2.6 Preparação da curva padrão .....	44
2.2.7 Quantificação da proporção X:Y por qPCR em tempo real .....	45
2.2.8 Determinação da proporção relativa do gene Y .....	46
2.2.9 Análise estatística .....	46
2.3 Resultados .....	47
2.4 Discussão .....	51
2.5 Conclusões .....	57
2.6 Agradecimentos .....	57
2.7 Referências .....	58
APÊNDICE .....	61

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1</b> – Curva padrão utilizada para a quantificação relativa da proporção de Y e de X nas amostras de sêmen. Legenda: X Standards (●): pontos da curva padrão para o gene X ( <i>MAOA</i> ); Y Standards (▲): pontos da curva padrão para o gene Y ( <i>SRY</i> ) .....	47
<b>FIGURA 2</b> – Resultados de fluorescência para a amplificação por qPCR dos genes X e Y das amostras. Legenda: – curva padrão e threshold do gene X; – curva padrão e threshold do gene Y; – amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene X; – amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene Y .....	49
<b>FIGURA 3</b> – Curva de dissociação para os produtos de amplificação dos genes X ( <i>MAOA</i> , A) e Y ( <i>SRY</i> , B) para as amostras da curva padrão de ambos os genes. Legenda: – amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene X; – amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene Y; – amostras do controle negativo (NTC) .....	49

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para quantificação dos genes específicos dos cromossomos sexuais X e Y .....	44
<b>Tabela 2</b> – Proporção relativa de espermatozoides com o cromossomo Y do sêmen sexado fêmea e sexado macho, em porcentagem $\pm$ desvio padrão, com valor de P (teste de Tukey) na comparação com o sêmen convencional (controle) .....	48
<b>Tabela 3</b> – Proporção relativa de espermatozoides com o cromossomo Y dos grupos após a separação magnética com os aptâmeros A7, B3, C12 e o pool dos aptâmeros, em porcentagem $\pm$ desvio padrão, com valor de P, comparado ao sêmen convencional (controle) .....	50

## USO DE APTÂMEROS NA SEXAGEM DE SÊMEN BOVINO

**RESUMO** – Novas metodologias para a sexagem de sêmen são buscadas devido à citometria de fluxo apresentar limitações e desvantagens e os aptâmeros surgem como potenciais candidatos para a identificação de espermatozoides conforme a presença do cromossomo X ou Y. Os objetivos foram avaliar o uso de três aptâmeros desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide Y na separação magnética por sexo de espermatozoides de touro, e desenvolver uma técnica de qPCR que permita realizar facilmente o diagnóstico da proporção sexual em amostras de sêmen. Protocolos de separação por magnetismo utilizando aptâmeros biotinilados foram utilizados em sêmen comercial, e duas frações de espermatozoides foram obtidas para cada aptâmero testado (livre e retida). A proporção relativa de espermatozoides Y foi analisada em reações de qPCR desenvolvidas para este objetivo. A curva padrão utilizada na qPCR foi eficiente para a quantificação da proporção sexual relativa em amostras de sêmen convencional e sexado. Diferença significativa da proporção relativa de Y foi encontrada na fração de espermatozoides livres do aptâmero C12 em relação ao controle (47,7% vs. 51,3%, respectivamente;  $P = 0,009$ ); as demais separações não apresentaram diferença significativa. Os aptâmeros selecionados não produziram o efeito desejado de separação do sêmen conforme a presença do cromossomo X ou Y, nestas condições utilizadas, mas a diminuição da proporção relativa de Y em uma das frações não retidas indica ser possível a obtenção de resultados em novos testes e protocolos, com diferentes concentrações de aptâmeros e tempos de exposição do sêmen.

**Palavras-chave:** Aptâmeros de Nucleotídeos; Bovinos; Espermatozoides; Pré-Seleção do Sexo; Real-Time PCR

## **APTAMERS IN BOVINE SPERM SEX-SORTING**

**SUMMARY** – Sex preselection of livestock offspring represents a big potential for genetic improvement. There are a search for new methods to sex-sort bull semen in order to avoid the limitations of flow cytometry/cell sorting technique. Aptamers emerge as potential candidates for sperm identification relative the presence of chromosome X or Y. In this work, the objectives were 1, to evaluate three aptamers developed to specifically binding to the Y-bearing sperm in magnetic separation by sex of bovine sperm and 2, to develop a SYBR Green Real-Time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen in semen samples. Separation protocols by magnetism using biotinylated aptamers were used in commercial semen, and two fractions of sperm were obtained for each tested aptamer (free and trapped). The relative ratio of Y-bearing spermatozoa was analyzed in qPCR reactions developed for this purpose. The standard curve for qPCR was efficiently designed to quantify the sex relative ratio of sorted and unsorted semen samples. Significant difference in the relative proportion of Y-bearing sperm was found in the fraction of free sperm samples from aptamer C12 compared to the control samples (47.7% vs. 51.3%, respectively;  $P = 0.009$ ); other separations showed no significant difference. Selected aptamers did not produce the wanted effect of sperm separation by the presence of chromosome X or Y, in these conditions used, but decreased relative proportion of Y-bearing sperm in one of the free fractions indicates possibility to obtain results in new testing and protocols, with different concentrations of aptamers and semen exposure times.

**Keywords:** Nucleotide Aptamers; Cattle; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Sex Preselection; Sex Ratio; Spermatozoa

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 Introdução e revisão de literatura

A utilização do sêmen sexado torna possível escolher o sexo dos descendentes antes mesmo da gestação ou da produção do embrião por qualquer técnica de reprodução. A vantagem está na possibilidade de planejar os nascimentos de machos e fêmeas de acordo com as necessidades do rebanho e do mercado. Na pecuária de corte é possível produzir, por exemplo, apenas animais machos para determinadas características como crescimento e conversão de alimentos, e em rebanhos de leite é intensificada a melhora genética sobre as fêmeas, programando a quantidade anual de novilhas de reposição.

Muitas tentativas foram realizadas ao longo do tempo, com graus variados de sucesso na sexagem espermática, mas o avanço foi realmente alcançado a partir do desenvolvimento da citometria de fluxo para seleção celular no início dos anos oitenta (GARNER et al., 1983; JOHNSON; FLOOK; LOOK, 1987). A eficiência na obtenção de espermatozoides selecionados pelo sexo levou ao desenvolvimento de um sistema capaz de realizar a sexagem e separar os espermatozoides para utilização comercial (JOHNSON, 2000; SEIDEL; GARNER, 2002).

Desde o primeiro anúncio da produção de descendentes a partir do sêmen sexado por citometria de fluxo (JOHNSON, 1989) até o momento, esta técnica tem sido utilizada com sucesso para separar o sêmen com grande acurácia em mais de 23 espécies de mamíferos, e descendentes normais já foram produzidos via inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV) em pelo menos sete espécies (GARNER, 2006).

Há apenas um método disponível utilizado nos dias de hoje, capaz de realizar de maneira precisa a sexagem de espermatozoides de mamíferos, a

citometria de fluxo com separação de células. Ela é realizada por um equipamento que mede a quantidade de DNA no espermatozoide; o espermatozoide bovino que contém o cromossomo X tem cerca de 4% a mais do que o espermatozoide que possui o cromossomo Y (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013; SEIDEL, 2014). A patente para essa tecnologia é atualmente licenciada para várias empresas em todo o mundo pela empresa Sexing Technologies (Navasota, TX, USA).

Entre as desvantagens desta técnica, largamente utilizada nos dias atuais, podemos citar o alto custo de produção do sêmen (patente exclusiva), o tempo gasto (que pode chegar até a 9 horas, com  $18-36 \times 10^6$  espermatozoides sexados por hora) para sexagem de um ejaculado, a alta quantidade de espermatozoides descartados (podendo chegar a 75% do ejaculado), menores índices de fertilidade quando comparado ao sêmen não sexado, maior quantidade de perda embrionária e maior taxa de retorno ao cio (SEIDEL, 2014). A maior parte das perdas envolvendo a fertilidade do sêmen sexado se deve às lesões dos espermatozoides provocadas pelo procedimento de sexagem. Estas lesões podem ser tanto mecânicas, quanto pela presença do corante intracelular ou pelo tempo de exposição dos espermatozoides ao ambiente durante o procedimento (SEIDEL, 2013). A presença destas perdas de fertilidade em relação ao sêmen convencional, descritas exaustivamente na literatura (SEIDEL, 2014), incentiva a busca de aprimoramento constante da técnica e também o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a separação dos espermatozoides quanto à presença do cromossomo sexual.

Os procedimentos para a sexagem de espermatozoides foram descritos diversas vezes (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013; SEIDEL; GARNER, 2002). A tecnologia de separação de células utiliza o corante fluorescente Hoechst 33342 para marcar o DNA de espermatozoides vivos, e com o auxílio de um citômetro de fluxo com separador de células, modificado especificamente para os espermatozoides, faz-se a medição da intensidade de fluorescência relativa à quantidade de DNA de um espermatozoide por vez, quando estes atravessam um feixe de laser e, em seguida, separa-se os espermatozoides baseado na

quantidade de DNA obtida. Em média, o espermatozoide com o cromossomo X contém de 3 a 7% mais DNA, nos mamíferos, que espermatozoide com o cromossomo Y (GARNER, 2006; JOHNSON, 1995).

A acurácia da sexagem dos espermatozoides por citometria de fluxo é de aproximadamente 85 a 95%, podendo chegar a apenas 70% em alguns casos (GARNER, 2006; JOHNSON, 2000; SEIDEL et al., 1999; WELCH; JOHNSON, 1999). Esta precisão de separação pode variar por formato da cabeça do espermatozoide, ângulo de leitura do espermatozoide, velocidade de passagem dos espermatozoides no feixe de laser, concentração dos espermatozoides no meio de citometria, entre outros fatores, fazendo com que uma grande quantidade de espermatozoides não sejam sexados e acabam sendo descartados juntamente com os espermatozoides mortos e lesionados (SEIDEL; GARNER, 2002). Se a simples orientação do espermatozoide no momento da leitura não for de 90° com relação ao feixe de laser, isto impede a medida correta da quantidade de DNA, podendo fazer com que apenas aproximadamente 10% dos espermatozoides sejam lidos corretamente (SEIDEL; GARNER, 2002).

Durante todo o procedimento de sexagem dos espermatozoides por citometria de fluxo, foram citados 12 passos que influenciam a eficiência da técnica e a quantidade total de espermatozoides sexados do ejaculado de um touro, podendo fazer com que ao final do procedimento apenas 22% dos espermatozoides, sendo metade de cada sexo, sejam obtidos (SEIDEL; GARNER, 2002), que é realmente uma quantidade pequena e uma grande perda de espermatozoides.

O equipamento utilizado é potente em velocidade e precisão, mas também é altamente custoso e, para efeitos práticos, não disponível, exceto no contexto de contratação ou de licenciamento dos serviços de sexagem de espermatozoides da empresa Sexing Technologies, detentora da patente da tecnologia (SEIDEL, 2014). Apesar de, atualmente, os equipamentos possuírem capacidade de avaliar e selecionar grande quantidade de espermatozoides por segundo, e a percentagem real de espermatozoides sexados depender da qualidade do sêmen, a tecnologia ainda não permite que todo o ejaculado de um



touro seja sexado dentro de um tempo viável para a manutenção da alta viabilidade dos espermatozoides, que pode ser de aproximadamente de sete a nove horas para todo sêmen ejaculado de um touro (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013). A saída encontrada para esta grande demora na sexagem do sêmen foi produzir doses com menor quantidade de espermatozoides, aproximadamente  $2 \times 10^6$  espermatozoides por palheta (SEIDEL, 2014).

A fertilidade com estas doses menores de sêmen sexado é menor que a fertilidade obtida utilizando-se sêmen convencional não sexado, e esse tem sido um dos limitantes da utilização do sêmen sexado por citometria de fluxo (SEIDEL; SCHENK, 2008). O conceito de inseminação com sêmen sexado em doses menores foi testada inicialmente com taxa de natalidade de 22,4% em novilhas que foram inseminadas com 1 a  $2 \times 10^5$  espermatozoides de sêmen sexado não congelado (SEIDEL et al., 1997). Logo depois disso, numerosos ensaios de campo foram realizados com número menor espermatozoides sexados congelado e não congelado, comparando com sêmen não sexado nas mesmas doses, e as taxas de prenhez de inseminações com espermatozoides sexados foram apenas de 60 a 90% das taxas obtidas com sêmen controle não-sexado (SARTORI et al., 2004; SCHENK; SUH; SEIDEL, 2006; SCHENK et al., 2009; SEIDEL et al., 1999).

Taxas de concepção de novilhas nulíparas inseminadas com sêmen sexado foram cerca de 20% menores em comparação com novilhas inseminadas com sêmen não sexado (DEJARNETTE et al., 2011). Embora as taxas de concepção com sêmen sexado foram melhoradas com a dose de  $10 \times 10^6$  espermatozoides, estas não se compararam a qualquer taxa encontrada utilizando sêmen convencional. Esse resultado indica a dificuldade de melhorar os resultados com o sêmen sexado, pois a dose comercialmente utilizada é muito menor ( $2 \times 10^6$  espermatozoides por dose), e o sêmen sexado não apresenta uma fertilidade potencialmente comparável ao sêmen convencional no estado atual de desenvolvimento da técnica.

A taxa de prenhez das fêmeas inseminadas com sêmen sexado macho foi menor que a taxa de prenhez de fêmeas inseminadas com sêmen

convencional (DOMINGUEZ et al., 2011). A maioria dos pesquisadores relata que as taxas de prenhez após a inseminação com sêmen sexado representam cerca de 75 a 80% dos valores observados com o uso de sêmen não-sexado (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2009; DEJARNETTE et al., 2008, 2011; SCHENK et al., 2009; SEIDEL; SCHENK, 2008).

Diferenças na qualidade do sêmen foram associadas com o processamento de sêmen e diferenças individuais na fertilidade de cada touro. Em estudo utilizando sêmen sexado, touros de maior fertilidade apresentaram melhores índices mesmo quando o número de espermatozoides por dose foi reduzida para a inseminação, enquanto que os touros que inicialmente tinham menor fertilidade também apresentaram índices de fertilidade menores que as dos touros com maior taxa de fertilidade mesmo utilizando-se doses com maior concentração de espermatozoides para a inseminação (SEIDEL; SCHENK, 2008).

O processo de separação dos espermatozoides pode causar danos estruturais e funcionais aos espermatozoides que comprometem a fertilização, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente após a superovulação (SARTORI et al., 2004).

O nível de lesão ao DNA dos espermatozoides após a sexagem por citometria de fluxo foi reportado em sêmen de touro (GARNER, 2006). No entanto, os danos aos espermatozoides sexados foram encontrados durante o início do processamento, uma vez que ocorre a interação destas células com condições não biológicas normais (SEIDEL; SCHENK, 2008; SUH; SCHENK; SEIDEL, 2005). O estresse mecânico e químico da marcação dos espermatozoides combinada com a centrifugação aumenta a porcentagem de espermatozoides mortos e danificados em até 10% (SUH; SCHENK; SEIDEL, 2005).

Fatores como dose inseminante com menor quantidade de espermatozoides, danos provocados pelo processo de sexagem e o tempo que demanda a sexagem dos espermatozoides, que fazem com que a fertilidade do sêmen sexado seja menor que a do sêmen não sexado (SEIDEL, 2014), além

da menor quantidade de doses produzidas ao final do procedimento, são suficientes para promover a busca de novos métodos de seleção dos espermatozoides pelo sexo.

A separação de espermatozoides humanos contendo cromossomo X e Y já foi relatada utilizando-se gradientes de albumina, onde os espermatozoides com o cromossomo Y são menores em tamanho e possuem uma velocidade maior de natação, atingindo o fundo de uma coluna com gradientes de alta densidade de albumina humana antes dos espermatozoides com cromossomo X; a fração enriquecida com espermatozoides Y estava no fundo da coluna, cerca de 22% do volume, com nascimento descrito de 70 a 80% de crianças do sexo masculino (ERICSSON; LANGEVIN; NISHINO, 1973), mas esta técnica nunca pôde ser muito precisamente testada por questões éticas e não provou possuir repetitividade em outras espécies de mamíferos (SEIDEL; GARNER, 2002), não sendo utilizada nos dias atuais.

A diferença na quantidade de DNA dos espermatozoides portadores de cromossomo X e Y provoca uma diferença de densidade e peso, o que permite a sua separação um gradiente contínuo de densidade de Percoll por centrifugação. Esta técnica tem sido utilizada em seres humanos e bovinos para separar células de espermatozoide contendo cromossomo X ou Y (KANEKO et al., 1983; LIMA et al., 2011; MACHADO et al., 2009), com resultados variados na eficiência da separação, em alguns casos não havendo diferença da proporção esperada de 1:1 na proporção de espermatozoides X e Y.

Espermatozoides contendo o cromossomo X são, teoricamente, maiores que os que contém o Y. Isso levou à tentativa de separar os espermatozoides utilizando-se microscopia de interferência e subsequente análise da imagem obtida para demonstrar a diferença de volume da cabeça dos espermatozoides que se assemelhavam com a diferença de DNA, e este princípio levou ao desenvolvimento de uma técnica de citometria de fluxo não utilizando marcadores de DNA, mas sim a imagem da microscopia (VAN MUNSTER et al., 1999). Separações com até 80% de precisão foram obtidos, mas os resultados para melhoria desta técnica não foram muito produtivos (VAN MUNSTER, 2002).

Para selecionar os espermatozoides quanto à presença do cromossomo X ou Y, é necessário que haja uma diferença entre eles, como por exemplo, na presença de proteínas expressas por ambos. O padrão de proteínas encontrado nos espermatozoides apresenta diferença entre os espermatozoides X e Y (CHEN et al., 2012). Uma variedade de proteínas é expressa diferencialmente entre os dois tipos de espermatozoides, e a quantidade de expressão de algumas proteínas pode diferir.

As diferenças na composição de proteínas de superfície entre espermatozoides com cromossomo X e Y pode ocorrer por duas possibilidades: a primeira, de que certos produtos de genes associados ao cromossomo sexual, ou controlados por este, são expressos durante a fase haploide das espermátides, no qual RNA mensageiros são rapidamente traduzidos e codificam proteínas que são transferidos para os sistemas de membrana e, a segunda, de que não ocorre a dinâmica de transferência destas proteínas entre as células através das pontes citoplasmáticas, ficando confinadas à espermátides em que foram produzidas (HENDRIKSEN, 1999; HOWES et al., 1997). Essas duas possibilidades ocorrendo em conjunto permitiriam a existência de diferenças entre os espermatozoides X e Y que poderiam ser utilizadas para a separação dos espermatozoides quanto ao cromossomo sexual.

Diversas tentativas de separar os espermatozoides através de técnicas imunológicas que detectam antígenos de superfície foram tentadas ao longo tempo, com graus variados de sucesso e repetitividade (HENDRIKSEN, 1999; HOPPE; KOO, 1984). Por muito tempo, buscou-se anticorpos específicos contra o antígeno HY, produzido pelo cromossomo Y (PETER; JONES; ROBINSON, 1993; SOUZA et al., 1999) ou anticorpos para proteínas sexo-específicas produzidas pelo cromossomo X (BLECHER et al., 1999). Bons resultados de produção de anticorpos para separação ou aglutinação dos espermatozoides foram encontrados em algum momento, mas a aplicabilidade desta técnica nunca chegou a ser comprovada na utilização prática cotidiana, apesar de ter gerado algumas patentes.

Genes que são expressos ou regulados pelo cromossomo X, como *UBE1X* (ubiquitin-activating enzyme E1) e *UBE2A* (ubiquitin-conjugating enzyme E2A), e pelo cromossomo Y, como *ZFY-1* e *2* (zinc-finger protein 1 e 2) e *SRY* (sex determining region Y), foram encontrados após a meiose nas espermátides, indicando a presença de transcritos associados exclusivamente aos espermatozoides X e Y, mas estas proteínas provavelmente são transferidas às células vizinhas por meio das pontes citoplasmáticas que ligam as espermátides após a meiose e deixam de ser sexo-específicas (HOWES et al., 1997).

Diferenças encontradas em proteínas expressas, como por exemplo algumas que compõem o citoesqueleto ou o axonema (DE CANIO et al., 2014), podem significar possíveis diferenças em proteínas presentes na membrana espermática que podem ser detectadas por diversos métodos. A utilização de microscopia de força atômica demonstrou que não há diferenças nos parâmetros dimensionais de cabeças de espermatozoides bovinos sexados, mesmo que as caudas dos espermatozoides não tenham sido investigadas (CARVALHO et al., 2013). O fracasso das tentativas anteriores para separar os espermatozoides X e Y com base em propriedades físicas poderiam levar à ideia de que este caminho pode não fornecer resultados melhores do que o método atual utilizado para a sexagem de espermatozoides, mas a análise proteômica permite identificar diferentes proteínas que podem ser empregadas como marcadores moleculares na tentativa de distinguir espermatozoides X e Y; no entanto, esta possibilidade é ligada ao acesso de anticorpos específicos para as proteínas alvo selecionadas para a detecção e, possivelmente, a separação de um tipo de célula reconhecido. Algumas proteínas, como a SACA1 (sperm acrosome membrane-associated 1), uma proteína de membrana de 34 kDa foi detectada no acrossoma e é expressa em quantidades muito maiores em espermatozoides X (DE CANIO et al., 2014). Nos seres humanos, a SACA1 foi demonstrada como potencialmente antigênica, e a sua localização acrossomal sugere que esta proteína, ou outra proteína de atuação semelhante, pode ser uma potencial candidata para a separação dos espermatozoides à base de anticorpo ou aptâmeros.

Também já foram encontradas diferenças em estrutura, morfologia, motilidade e metabolismo energético entre os espermatozoides X e Y (CUI; MATTHEWS, 1993; DE CANIO et al., 2014), embora estudos venham afirmar que estas diferenças não são significativas entre as populações de espermatozoides (CARVALHO et al., 2013; HOSSAIN; BARIK; KULKARNI, 2001) ou estas diferenças de composição não foram encontradas em proteínas de membrana (HENDRIKSEN, 1999).

Procedimento de sexagem dos espermatozoides através de produção de anticorpos monoclonais para proteínas sexo-específicas em bovinos foi experimentado (BLECHER et al., 1999). Proteínas específicas relacionadas aos espermatozoides com cromossomo X foram encontradas e os anticorpos produzidos foram capazes de aglutinar aproximadamente 50% dos espermatozoides, e os espermatozoides não aglutinados, utilizados em procedimento de FIV, produziram embriões com quantidade de machos superior a 90%.

Outra técnica imunológica que visa marcar os espermatozoides com cromossomo Y foi desenvolvida com base na produção de anticorpos monoclonais para uma proteína de 19 kDa presente na membrana plasmática dos espermatozoides bovinos (SOUZA et al., 1999), revelado por imunofluorescência em microscopia e citometria de fluxo. O epítipo reconhecido pelo anticorpo produzido esteve presente em 49,7% da população de espermatozoides e, quando adicionado ao sêmen bovino fresco, reduziu a motilidade e promoveu a aglutinação dos espermatozoides.

Método para rapidamente separar os espermatozoides com cromossomo Y, com base na presença do antígeno HY na superfície da célula foi desenvolvido e testado (PETER; JONES; ROBINSON, 1993), no qual a separação foi realizada por método imunomagnético desenvolvido para remover os espermatozoides que se ligaram à IgG anti-H-Y. Após marcação e separação, menos de 1,2% dos espermatozoides encontrados no sobrenadante apresentaram fluorescência para presença do antígeno H-Y, e se considerarmos que apenas os espermatozoides com cromossomo Y apresentam este antígeno

na superfície, este procedimento removeu quase todos espermatozoides Y, produzindo uma população de mais de 98% de espermatozoides X, mostrando ser promissora a tentativa de sexagem pelas características imunológicas dos espermatozoides (SEIDEL; GARNER, 2002). Esses diferentes antígenos de superfície podem ser detectados por anticorpos produzidos para esse fim e também por uma nova categoria de moléculas cujo interesse aumentou na última década, os chamados aptâmeros.

Aptâmeros são moléculas de ácido nucleico simples fita, de DNA ou RNA, modificados ou não, com apropriada sequência de nucleotídeos e estrutura que possuem ligações características capazes de formar complexos com moléculas alvo. Aptâmeros apresentam forma tridimensional específica e complexa caracterizada por troncos, “loops”, protuberâncias, “hairpins”, entre outras formas (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Com base nas suas estruturas tridimensionais, aptâmeros podem se ligar a uma grande variedade de alvos, sejam eles moléculas individuais, misturas complexas de alvos ou organismos inteiros.

A ligação dos aptâmeros aos seus alvos se originam da compatibilidade da estrutura, estabilização de anéis aromáticos, interações eletrostáticas ou de van der Waals, pontes de hidrogênio ou uma interação entre estes efeitos (HERMANN; PATEL, 2000). O conceito da ligação entre ácidos nucleicos e proteínas começou a se formar no início dos anos 1980, a partir de pesquisas com adenovírus e o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esses vírus codificavam pequenos fragmentos de RNA que se ligavam a proteínas virais ou do hospedeiro, com alta afinidade e especificidade, com capacidade de regular a transativação e replicação viral ou a tradução do RNA viral (DOLLINS; NAIR; SULLENGER, 2008).

Desde as primeiras descrições e o desenvolvimento do princípio de seleção dos aptâmeros pelo processo de SELEX (“systematic evolution of ligands by exponential enrichment”) (ELLINGTON; SZOSTAK, 1990; TUERK; GOLD, 1990), várias metodologias têm sido empregadas para melhoria da

seleção e especificidade dos aptâmeros (BOCK et al., 1992; ELLINGTON; SZOSTAK, 1992; ZHU; LIU; KAI, 2015).

Aptâmeros se mostraram com grande potencial em aplicações analíticas, pois podem ser facilmente produzidos por síntese química e, assim, ser facilmente modificados com moléculas repórter, ligantes, e outros grupos funcionais (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Os aptâmeros vem sendo utilizados com sucesso para vários propósitos. Entre algumas das funcionalidades recentemente descritas para os aptâmeros, encontramos um teste da presença de resíduos de tetraciclina no leite (JEONG; RHEE PAENG, 2012), utilização como inibidor da migração de células de câncer mamário (IIDA et al., 2014), além de várias outras aplicações, incluindo diagnóstico, descoberta de biomarcadores, validação de alvo, terapêutica e carreamento e entrega de drogas (“drug delivery”) (ZHOU et al., 2012; ZHU; LIU; KAI, 2015).

As proteínas são facilmente desnaturadas e perdem a sua estrutura terciária a temperaturas elevadas, enquanto que os oligonucleotídeos são mais termicamente estáveis e capazes de manter as suas estruturas ao longo de ciclos repetidos de desnaturação e renaturação. Assim, a maior vantagem de aptâmeros em relação aos anticorpos à base de proteínas é a sua estabilidade a temperaturas elevadas. Aptâmeros recuperam sua conformação nativa e podem se ligar a alvos após aquecimento, enquanto que os anticorpos são submetidos facilmente à desnaturação irreversível (SONG; LEE; BAN, 2012). Assim, aptâmeros podem ser utilizados sob uma ampla gama de condições de ensaio.

A produção de aptâmeros, e suas consequentes síntese e alteração, é mais simples que a produção de anticorpos (KEEFE; PAI; ELLINGTON, 2010; SONG; LEE; BAN, 2012). A identificação e produção de anticorpos monoclonais são processos laboriosos e muito dispendiosos que envolvem o rastreamento de um grande número de colônias bacterianas. Além disso, o sucesso comercial de anticorpos conduziu à necessidade da produção em grande escala em cultura de células de mamífero. Imunoensaios são necessários para confirmar a atividade dos anticorpos em cada novo lote, porque o desempenho do mesmo



anticorpo tende a variar de acordo com o lote. No entanto, aptâmeros, uma vez selecionados, podem ser sintetizados em grande quantidade com grande precisão e reprodutibilidade por meio de reações químicas. Estes processos químicos são mais rentáveis do que a produção de anticorpos. Além disso, aptâmeros podem ser facilmente modificados por várias reações químicas para aumentar a sua estabilidade e resistência à nuclease (JAYASENA, 1999). Além disso, é possível introduzir sinalizadores, tais como fluoróforos e “quenchers”, facilitando a fabricação de biossensores.

Um outro fator de vantagem dos aptâmeros sobre os anticorpos é a baixa imunogenicidade (SONG; LEE; BAN, 2012). Aptâmeros também apresentam baixa toxicidade. Isso porque os ácidos nucleicos não são normalmente reconhecidos, pelo sistema imune, como agentes externos. No entanto, os anticorpos são significativamente imunogênicos, dificultando a repetição de dosagens (IRESON; KELLAND, 2006; KEEFE; PAI; ELLINGTON, 2010). Além disso, quando se trata de toxinas ou moléculas que não induzem fortes respostas imunes, a identificação e produção de anticorpos se torna difícil, mas aptâmeros podem ser gerados em números suficientes. Além disso, aptâmeros mostram uma alta afinidade e especificidade para alguns ligantes que não podem ser reconhecidos por anticorpos, tais como os íons ou moléculas pequenas, indicando que o emprego de aptâmeros como os componentes de reconhecimento pode ampliar significativamente as aplicações de biossensores (JAYASENA, 1999; SONG; LEE; BAN, 2012). Com base nas muitas vantagens acima descritas, aptâmeros são considerados como uma boa alternativa aos anticorpos em muitas aplicações biológicas.

Como mencionado anteriormente, a seleção dos aptâmeros *in vitro* (SELEX) é uma técnica utilizada para isolar aptâmeros com elevada afinidade para um determinado alvo, a partir de bibliotecas de aproximadamente  $10^{12}$  a  $10^{15}$  combinações de oligonucleotídeos. Em geral, o processo de SELEX é composto de três etapas que se repetem de modo a procurar nucleotídeos que são mais capazes de se ligarem ao alvo (SONG; LEE; BAN, 2012; SYED; PERVAIZ, 2010; ZHOU et al., 2012; ZHU; LIU; KAI, 2015). No primeiro passo,

uma biblioteca de aptâmeros é sintetizada, compostos de regiões de sequência aleatória, geralmente de 30-40 nucleotídeos, flanqueados pelo local de ligação dos primers, de sequência conhecida, e em seguida é convertida em nucleotídeos de fita simples; esta etapa é a geração da biblioteca. Na segunda etapa, de ligação e separação, os componentes da biblioteca são expostos ao alvo, e os aptâmeros ligados ao alvo são separados dos componentes não ligados; este passo é geralmente combinado com vários outros métodos para fazer a seleção do alvo ou da biblioteca de maneira fácil e rápida. Finalmente, no terceiro passo (amplificação), os componentes da biblioteca ligados ao alvo são amplificados por PCR para criar uma nova biblioteca, para ser utilizado na fase seguinte. Aptâmeros são continuamente desenvolvidos através deste processo em ciclos, repetidos geralmente de 10 a 15 vezes, para haver o enriquecimento dos aptâmeros ligados ao alvo nos componentes da biblioteca (SONG; LEE; BAN, 2012; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; SYED; PERVAIZ, 2010). Além deste método simples, variantes podem ser utilizadas para a seleção dos aptâmeros, usando-se diversas técnicas, como seleção por filtragem em membrana de nitrocelulose, por cromatografia de afinidade, por utilização de microesferas magnéticas, por eletroforese capilar, por micro fluídos, por células, entre outros (SONG; LEE; BAN, 2012; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

A seleção de aptâmeros baseado em células, chamado de “cell-SELEX”, visa encontrar aptâmeros contra células inteiras, ao passo que os principais alvos dos outros métodos SELEX são proteínas únicas altamente purificadas. Em outras palavras, os alvos de cell-SELEX são proteínas na superfície das células ou estruturas únicas destas células. Na maioria dos casos, os processos cell-SELEX tem etapas de lavagem (para células adesivas) ou de centrifugação (para células em suspensão) durante a separação dos aptâmeros, pois a imobilização do alvo não é possível. Além disso, passos com células que não são o alvo são necessários em cada round, para evitar a seleção de aptâmeros não específicos para a superfície da célula alvo e que são geralmente localizados nas superfícies de várias células. Portanto, este método é complicado, devido à

impossibilidade da imobilização dos alvos e devido à chamada seleção negativa. No entanto, os aptâmeros resultantes, uma vez selecionados, podem ser poderosos para o diagnóstico específico destas células, para entrega de droga direcionada de células (“drug delivery”), e para a terapia específica para a célula alvo (OHUCHI, 2012; SONG; LEE; BAN, 2012; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; ZHOU et al., 2012).

O método de ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”), um dos principais testes para diagnósticos clínicos disponíveis, é uma técnica versátil para detectar quase qualquer proteína ou peptídeo com alta sensibilidade. A técnica conhecida por ELISA sanduíche envolve a utilização simultânea de dois anticorpos para ligação e captura do alvo e para reportar a detecção do mesmo. Um ensaio semelhante, utilizando-se aptâmeros (ALISA) foi descrito, demonstrando a praticidade deste método através de um estudo comparativo com ELISA utilizando anticorpos. É importante notar que os aptâmeros têm um potencial ilimitado para contornar as limitações associadas com anticorpos (VIVEKANANDA; KIEL, 2006). Nos métodos de ALISA, aptâmeros têm sido utilizados como moléculas de captura de sonda, com base na sua afinidade e seletividade para os alvos. Como resultado, os sensores apresentam um excelente desempenho no diagnóstico de doenças (SONG; LEE; BAN, 2012).

Para a detecção de moléculas pequenas, aptâmeros são utilizados mais facilmente, pois a detecção com anticorpos tem limitações que aptâmeros amplamente superam. Foram descritas numerosas técnicas de aptâmeros incorporando sensores para detecções, tais como eletroquímica, colorimétrica, fluorescência, e os métodos sensíveis à massa. Estes biossensores à base de aptâmeros estão sendo empregados em vários campos, incluindo as áreas médicas e industriais (KEEFE; PAI; ELLINGTON, 2010; SONG; LEE; BAN, 2012; SYED; PERVAIZ, 2010; ZHOU et al., 2012).

Nanopartículas de ouro, juntamente com anticorpos, são utilizadas como agentes de contraste específico na detecção de certos marcadores de moléculas relacionadas a alguns tipos de câncer, como o de mama. Os anticorpos monoclonais são os agentes de ligação, enquanto que as nanopartículas de ouro

servem como agentes de contraste em imagem. Os aptâmeros podem ser utilizados no lugar de anticorpos como moléculas ligantes (HUANG et al., 2008; ZHAO et al., 2007).

Desde a seleção do primeiro aptâmero de DNA, dezenas foram selecionados para o diagnóstico de doenças. Embora não existam ferramentas de diagnóstico à base de aptâmeros que estão em uso clínico no momento, muitos estudos pré-clínicos indicam que os aptâmeros têm um grande potencial para ser utilizado desta forma (ZHU; LIU; KAI, 2015). Devido à conveniência da seleção por cell-SELEX, que não requer purificação e preparação das moléculas alvo, os aptâmeros podem ser selecionados com células cancerígenas, visando diagnosticar o câncer através da imagem do tecido. Entre os estudos recentes que utilizam aptâmeros de DNA como uma ferramenta de diagnóstico para doenças em humanos, foram listados aptâmeros selecionados para células cancerígenas em pâncreas, cólon, estômago, próstata e mama, entre outros tecidos (ZHU; LIU; KAI, 2015).

Para o diagnóstico de agentes infecciosos, grande quantidade de aptâmeros têm sido selecionados, principalmente através de cell-SELEX e métodos baseados na utilização de microesferas magnéticas, visando diversos vírus, bactérias ou proteínas antigênicas, incluindo alvos como vírus influenza, vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), papilomavírus humano (HPV), *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* patogênicas (HONG; SOOTER, 2015).

Há também aptâmeros selecionados para marcadores de enfermidades não infecciosas, tais como doenças cardíacas. No caso, moléculas como mioglobina, proteína C reativa, L-homocisteína e trombina tem sido utilizadas para selecionar aptâmeros com a função de auxiliar no diagnóstico da ocorrência destas enfermidades (ZHU; LIU; KAI, 2015)

Ao longo das duas últimas décadas, tem havido um aumento contínuo na pesquisa de aptâmeros, também chamados de elementos de reconhecimento molecular (MRE). Aptâmeros de DNA de fita simples têm várias vantagens sobre os anticorpos, em termos de estabilidade, capacidade de reutilização e custo de

produção. No entanto, os aptâmeros possuem suas limitações. A afinidade de ligação é altamente dependente da sua estrutura tridimensional e é influenciada por fatores tais como a condição iônica, temperatura, pH e a condição de ligação (PATEL, 1997; PATEL et al., 1997). Também existem ainda problemas com ligações inespecíficas a moléculas presentes no ambiente celular ou tecidual. Estas limitações dificultam, mas não impossibilitam, o uso de aptâmeros para a detecção de várias amostras complexas, tais como fluidos biológicos e matrizes alimentares. Um esquema de seleção cuidadosamente projetado pode melhorar significativamente a especificidade dos aptâmeros identificados, que podem detectar especificamente moléculas em baixas concentrações no meio. Utilizar bases modificadas durante a amplificação por PCR ou realizar modificações de bases após a seleção dos aptâmeros também podem ajudar a melhorar a resistência a nucleases em muitos fluidos biológicos, tais como soro humano (HONG; SOOTER, 2015).

Como o campo de biossensores baseados em aptâmeros continua a crescer, melhorias na metodologia de SELEX serão necessárias para selecionar aptâmeros com a afinidade e especificidade desejada mais rapidamente. Melhorias na técnica também serão necessárias para permitir que aptâmeros sejam produzidos contra mais de uma molécula alvo. O desenvolvimento de sensores baseados em aptâmeros está se tornando um campo cada vez mais diversificado, e cientistas e engenheiros de diferentes áreas podem trabalhar juntos a fim de criar um produto final ideal. Biossensores de aptâmeros portáteis podem ser utilizados visando uma variedade de objetivos, tais como segurança alimentar, monitoramento ambiental e de saúde. As muitas características e vantagens dos aptâmeros lança aos pesquisadores uma imediata necessidade de continuar a investigar e otimizar suas aplicações como biossensores, e as possibilidades ainda são muitas e algumas permanecem inexploradas.

Por essas possíveis diferenças existentes entre os espermatozoides com cromossomos X e Y e a capacidade dos aptâmeros em detectar e se ligar a proteínas específicas, os objetivos do presente estudo foram verificar a eficiência de aptâmeros desenvolvidos para se ligarem especificamente ao

espermatozoide bovino portador do cromossomo Y durante o procedimento de separação magnética por sexo e, para verificar a eficiência da ferramenta, desenvolver uma técnica de PCR quantitativo em tempo real que permita realizar facilmente o diagnóstico da proporção relativa entre espermatozoides X e Y, em amostras de sêmen bovino convencional e sexado.

## 1.2 Referências

BLECHER, S. R.; HOWIE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1309–1321, 1999.

BOCK, L. C.; GRIFFIN, L. C.; LATHAM, J. A.; VERMAAS, E. H.; TOOLE, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. **Nature**, v. 355, n. 6360, p. 564–566, 1992.

CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Nanoscale differences in the shape and size of X and Y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, e59387, 2013.

CHEN, X.; ZHU, H.; WU, C.; HAN, W.; HAO, H.; ZHAO, X.; DU, W.; QIN, T.; LIU, Y.; WANG, D. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 59–67, 2012.

CUI, K. H.; MATTHEWS, C. D. X larger than Y. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 117–118, 1993.

DE CANIO, M.; SOGGIU, A.; PIRAS, C.; BONIZZI, L.; GALLI, A.; URBANI, A.; RONCADA, P. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 6, p. 1264–1271, 2014.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MCCLEARY, C. R.; MORENO, J. F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3477–3483, 2011.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MORENO, J. F.; MCCLEARY, C. R.; LENZ, R. W. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1778–1785, 2008.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 49–58, 2009.

DOLLINS, C. M.; NAIR, S.; SULLENGER, B. A. Aptamers in immunotherapy. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 5, p. 443–450, 2008.

DOMINGUEZ, J. H. E.; COSTA, D. S.; JOJOT CENTURION, V.; FARIA, F. J. C. Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 127–131, 2011.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 818–822, 1990.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. **Nature**, v. 355, n. 6363, p. 850–852, 1992.

ERICSSON, R. J.; LANGEVIN, C. N.; NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, v. 246, n. 5433, p. 421–424, 1973.

GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 943–957, 2006.

GARNER, D. L.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Methods in Molecular Biology**, v. 927, p. 279–295, 2013.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A.; JOHNSON, L. A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 312–321, 1983.

HENDRIKSEN, P. J. M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1295–1307, 1999.

HERMANN, T.; PATEL, D. J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 820–825, 2000.

HONG, K. L.; SOOTER, L. J. Single-stranded DNA aptamers against pathogens and toxins: identification and biosensing applications. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 419318, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/419318>. Acesso em: 16 outubro 2015.

HOPPE, P. C.; KOO, G. C. Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 1984.

HOSSAIN, A. M.; BARIK, S.; KULKARNI, P. M. Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells (spermatids) exposed to different prehybridization treatments. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 119–123, 2001.

HOWES, E. A.; MILLER, N. G.; DOLBY, C.; HUTCHINGS, A.; BUTCHER, G. W.; JONES, R. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 2, p. 195–204, 1997.

HUANG, Y. F.; LIN, Y. W.; LIN, Z. H.; CHANG, H. T. Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells through light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 4, p. 775–783, 2008.

IIDA, J.; CLANCY, R.; DORCHAK, J.; SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; CUTLER, M. L.; MURAL, R. J.; SHRIVER, C. D. DNA aptamers against exon v10 of CD44 inhibit breast cancer cell migration. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88712, 2014.

IRESON, C. R.; KELLAND, L. R. Discovery and development of anticancer aptamers. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 12, p. 2957–62, 2006.

JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1628–50, 1999.

JEONG, S.; RHEE PAENG, I. Sensitivity and selectivity on aptamer-based assay: the determination of tetracycline residue in bovine milk. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 159456, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3324139>. Acesso em: 20 novembro 2015.

JOHNSON, L. A. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 2, p. 199–203, 1989.

JOHNSON, L. A. 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, n. 4, p. 893–903, 1995.

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



JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. 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, n. 3, 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.

KEEFE, A. D.; PAI, S.; ELLINGTON, A. Aptamers as therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 7, p. 537–550, 2010.

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

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA-FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289–1297, 2009.

OHUCHI, S. Cell-SELEX Technology. **BioResearch Open Access**, v. 1, n. 6, p. 265–72, 2012.

PATEL, D. J. Structural analysis of nucleic acid aptamers. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 1, p. 32–46, 1997.

PATEL, D. J.; SURI, A. K.; JIANG, F.; JIANG, L.; FAN, P.; KUMAR, R. A.; NONIN, S. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 5, p. 645–64, 1997.

PETER, A. T.; JONES, P. P.; ROBINSON, J. P. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1177–1185, 1993.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; WILTBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86–90, 2004.

SCHENK, J. L.; CRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL, G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 717–28, 2009.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL, G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 299–307, 2006.

SEIDEL, G. E. Application of sex-selected semen in heifer development and breeding programs. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 619–625, 2013.

SEIDEL, G. E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v. 8, n. Suppl 1, p. 160–164, 2014.

SEIDEL, G. E.; ALLEN, C. H.; JOHNSON, L. A.; HOLLAND, M. D.; BRINK, Z.; WELCH, G. R.; GRAHAM, J. K.; CATTELL, M. B. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1255–1264, 1997.

SEIDEL, G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 733–743, 2002.

SEIDEL, G. E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 1-2, p. 129–138, 2008.

SEIDEL, G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; DOYLE, S. P.; BRINK, Z.; GREEN, R. D.; CRAN, D. G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1407–1420, 1999.

SONG, K.-M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. **Sensors**, v. 12, n. 1, p. 612–631, 2012.

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

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 4, p. 381–403, 2007.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1035–1048, 2005.

SYED, M. A.; PERVAIZ, S. Advances in aptamers. **Oligonucleotides**, v. 20, n. 5, p. 215–224, 2010.

TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 1990.

VAN MUNSTER, E. B.; STAP, J.; HOEBE, R. A.; TE MEERMAN, G. J.; ATEN, J. A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1281–1293, 1999.

VAN MUNSTER, E. B. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y-chromosome-bearing bull spermatozoa. **Cytometry**, v. 47, n. 3, p. 192–199, 2002.

VIVEKANANDA, J.; KIEL, J. L. Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. **Laboratory investigation**, v. 86, n. 6, p. 610–618, 2006.

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, n. 8, p. 1343–1352, 1999.

ZHAO, W.; CHIUMAN, W.; BROOK, M. A.; LI, Y. Simple and rapid colorimetric biosensors based on DNA aptamer and noncrosslinking gold nanoparticle aggregation. **ChemBioChem**, v. 8, n. 7, p. 727–731, 2007.

ZHOU, J.; BOBBIN, M. L.; BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J. Current progress of RNA aptamer-based therapeutics. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 234, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2012.00234>. Acesso em: 29 outubro 2015.

ZHU, Q.; LIU, G.; KAI, M. DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 20979–20997, 2015.

## CAPÍTULO 2 – USO DE APTÂMEROS NA SEXAGEM DE SÊMEN BOVINO

**RESUMO** – A possibilidade de pré-selecionar o sexo dos descendentes representa um enorme potencial de melhoramento genético na criação de gado. Novas metodologias para a seleção de espermatozoides quanto ao sexo são buscadas devido à sexagem por citometria de fluxo apresentar algumas limitações e desvantagens. Entre estas novas tecnologias, os aptâmeros surgem como potenciais candidatos para a identificação específica de espermatozoides com relação à presença do cromossomo sexual, que pode ser utilizada como ferramenta para a sexagem espermática. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar o uso de três aptâmeros (A7, B3 e C12) desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide portador do cromossomo Y na separação magnética por sexo de espermatozoides de touro, e desenvolver uma técnica de qPCR que permita realizar facilmente o diagnóstico da proporção relativa entre espermatozoides X e Y em amostras de sêmen bovino convencional e sexado. Sêmen comercial foi utilizado em protocolos de separação dos espermatozoides por magnetismo utilizando aptâmeros biotinizados, e foram obtidas duas frações de espermatozoides para cada aptâmero testado (fração livre e fração retida), e a proporção relativa de espermatozoides Y foi obtida em reações de qPCR desenvolvidas para este objetivo. Diferença significativa da proporção relativa de Y foi encontrada na fração de espermatozoides livres do aptâmero C12 quando comparada ao controle (47,7% vs 51,3%, respectivamente;  $P = 0,009$ ); as demais separações não apresentaram diferença significativa. A curva padrão utilizada na qPCR mostrou-se eficiente para a quantificação da proporção relativa de espermatozoides X e Y em amostras de sêmen convencional e sexado, com baixo coeficiente de variação entre as reações. Os aptâmeros selecionados e utilizados não produziram o efeito desejados de marcação e separação dos espermatozoides conforme a presença do cromossomo X ou Y, nestas condições, mas a diminuição da proporção relativa de Y em uma das

separações indica a possibilidade de obtenção de bons resultados em novos testes e novos protocolos de concentração de aptâmeros e tempo de exposição.

**Palavras-chave:** Aptâmeros de Nucleotídeos; Bovinos; Espermatozoides; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Sêmen-sexagem

## 2.1 Introdução

Desde o início da utilização da inseminação artificial, sempre houve grande interesse na utilização do sêmen sexado, que possibilitaria escolher o sexo dos descendentes antes mesmo da gestação ou da produção do embrião por qualquer técnica de reprodução. A vantagem está na possibilidade de planejar os nascimentos de machos e fêmeas de acordo com as necessidades do rebanho e do mercado. Na pecuária de corte é possível produzir, por exemplo, apenas animais machos para determinadas características como crescimento e conversão de alimentos, e em rebanhos de leite é intensificada a melhora genética sobre as fêmeas, programando a quantidade anual de novilhas de reposição. Muitas tentativas foram realizadas ao longo do tempo, com graus variados de sucesso na sexagem espermática, mas o avanço foi realmente alcançado a partir do desenvolvimento da citometria de fluxo para seleção celular no início dos anos oitenta (GARNER et al., 1983; JOHNSON; FLOOK; LOOK, 1987). A eficiência na obtenção de espermatozoides selecionados pelo sexo levou ao desenvolvimento de um sistema capaz de realizar a sexagem e separar os espermatozoides para utilização comercial (JOHNSON, 2000; SEIDEL; GARNER, 2002).

Os procedimentos para a sexagem de espermatozoides foram descritos diversas vezes (SEIDEL; GARNER, 2002; GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013). O equipamento utilizado é impressionante em velocidade e precisão, mas também é altamente custoso e, para efeitos práticos, não disponível, exceto no contexto

de contratação ou de licenciamento dos serviços de sexagem de espermatozoides de Sexing Technologies, detentores da patente da tecnologia (SEIDEL, 2014). Apesar de, atualmente, os equipamentos possuírem capacidade de avaliar e selecionar grande quantidade de espermatozoides por segundo, e a percentagem real de espermatozoides sexados depender da qualidade do sêmen, a tecnologia ainda não permite que todo o ejaculado de um touro seja sexado dentro de um tempo viável para a manutenção da alta viabilidade dos espermatozoides, que pode ser de aproximadamente de sete a nove horas para todo sêmen ejaculado de um touro (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013). Além do tempo que demanda a sexagem dos espermatozoides, fatores como dose inseminante com menor quantidade de espermatozoides e danos provocados pelo processo de sexagem fazem com que a fertilidade do sêmen sexado seja menor que a do sêmen não sexado (SEIDEL, 2014), e promovem a busca de novos métodos alternativos de seleção dos espermatozoides pelo sexo.

O padrão de proteínas encontrado nos espermatozoides apresenta diferença entre os espermatozoides com cromossomo X e Y (CHEN et al., 2012). Uma variedade de proteínas é expressa diferencialmente entre os dois tipos de espermatozoides, e a quantidade de expressão de algumas proteínas pode diferir. Também já foram encontradas diferenças em estrutura, morfologia, motilidade e metabolismo energético entre os espermatozoides X e Y (CUI; MATTHEWS, 1993; DE CANIO et al., 2014), embora estudos afirmem que estas diferenças não são significativas (HOSSAIN; BARIK; KULKARNI, 2001; CARVALHO et al., 2013) ou não foram encontradas em proteínas de membrana (HENDRIKSEN, 1999). Diferenças encontradas em proteínas expressas, como por exemplo algumas que compõem o citoesqueleto ou o axonema (DE CANIO et al., 2014), podem significar possíveis diferenças em proteínas presentes na membrana espermática que podem ser detectadas por diversos métodos.

Aptâmeros são moléculas de ácido nucleico de fita simples, de DNA ou RNA, modificados ou não, com apropriada sequência de nucleotídeos e estrutura que possuem ligações características capazes de formar complexos com

moléculas alvo. Aptâmeros apresentam forma tridimensional específica e complexa caracterizada por troncos, loops, protuberâncias, “hairpins”, entre outras formas (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Com base nas suas estruturas tridimensionais, aptâmeros podem se ligar a uma grande variedade de alvos, sejam eles moléculas individuais, misturas complexas de alvos ou organismos inteiros. A ligação dos aptâmeros aos seus alvos se originam da compatibilidade da estrutura, estabilização de anéis aromáticos, interações eletrostáticas ou de van der Waals, pontes de hidrogênio ou uma interação entre estes efeitos (HERMANN; PATEL, 2000). Desde o desenvolvimento do princípio de seleção dos aptâmeros pelo processo de SELEX (do inglês *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (ELLINGTON; SZOSTAK, 1990; TUERK; GOLD, 1990), aptâmeros se mostraram com grande potencial em aplicações analíticas, pois podem ser facilmente produzidos por síntese química e, assim, ser facilmente modificados com moléculas repórter, ligantes, e outros grupos funcionais (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

Por essas possíveis diferenças existentes entre os espermatozoides com cromossomos X e Y e a capacidade dos aptâmeros de detectar e se ligar a proteínas específicas, os objetivos do presente estudo foram verificar a eficiência de aptâmeros desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide bovino portador do cromossomo Y durante o procedimento de separação magnética por sexo e, para verificar a eficiência da ferramenta, desenvolver uma técnica de PCR quantitativo em tempo real que permita realizar facilmente o diagnóstico da proporção relativa entre espermatozoides X e Y, em amostras de sêmen bovino convencional e sexado.

## 2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Endotoxemia e Enfermidades de Grandes Animais (LEEGA) e no Laboratório de Epigenômica, localizados à Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba.

### 2.2.1 Produção e seleção de aptâmeros

Os aptâmeros utilizados neste experimento foram desenvolvidos por DNApta Biotecnologia Ltda., como parte de um projeto de pesquisa do programa PIPE/FAPESP, com patente depositada no INPI (AOKI; LOVATO; PEITL JR, 2012). A sequência de nucleotídeos destes aptâmeros não pode ser fornecida devido ao interesse comercial da empresa fornecedora.

Resumidamente, uma biblioteca aleatória de sequências de DNA, biotinizadas, contendo 66 nucleotídeos, sendo 30 destes nucleotídeos aleatórios (os restantes 36 nucleotídeos apresentam sequência conhecida para a identificação dos primers, sendo 18 no início e 18 no final da sequência), foi utilizada para seleção dos aptâmeros em 15 rodadas de SELEX, nos quais foram utilizados sêmen comercial sexado fêmea e macho de touro da raça Nelore, para a obtenção de aptâmeros com afinidade específica aos espermatozoides com cromossomo Y (macho). Estas sequências foram clonadas, sequenciadas e identificadas (AOKI; LOVATO; PEITL JR, 2012). A representação esquemática da seleção dos aptâmeros se encontra na Figura 1 do Apêndice. A afinidade dos aptâmeros com espermatozoides foi confirmada por microscopia invertida de fluorescência e confocal após síntese individual de cada aptâmero identificado, ligados a marcadores de fluorescência e colocados em contato com espermatozoides (Apêndice, Figura 2) (AOKI; LOVATO; PEITL JR, 2012).



De um vasto número de sequências encontradas, três aptâmeros foram selecionados e sintetizados (Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), com a ligação de biotina na extremidade 5' dos aptâmeros, e identificados como A7, B3 e C12. Estes aptâmeros foram diluídos na concentração de 100 pmol/ $\mu$ L. Além dos três aptâmeros, que foram testados individualmente, foi preparado um misto deles, denominado "Pool", na concentração de 100 pmol/ $\mu$ L de cada um dos aptâmeros. Estes aptâmeros foram desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide que possui o cromossomo Y, e visam, em separação magnética, reter estes espermatozoides, deixando livres no diluente/meio os espermatozoides com cromossomo X.

### *2.2.2 Preparação do sêmen*

Sêmen comercial de touro (CRV Lagoa da Serra, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado para os experimentos de separação espermática por sexo. Palhetas de sêmen convencional e de sêmen sexado fêmea e macho de um mesmo touro da raça Nelore foram selecionadas de acordo com o lote de produção serem de datas próximas, sendo que as de sêmen sexado foram produzidas no mesmo dia (mesmo lote). As palhetas eram do tipo fina e possuíam o volume de 0,25 mL de sêmen.

Duas palhetas de sêmen convencional foram descongeladas a 35°C por 20 segundos, de acordo as recomendações da empresa fornecedora, foram deixadas para estabilizar à temperatura ambiente por 5 minutos (todos os procedimentos a seguir descritos foram realizados à esta temperatura), e o sêmen foi adicionado a um tubo de 15 mL contendo 4,5 mL de PBS. Após leve agitação para homogeneização, o sêmen foi centrifugado a 500 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet de sêmen foi ressuspendido suavemente com 4,5 mL de PBS, e foi novamente centrifugado a 500 x g por 5

minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet de sêmen foi então ressuspenso e homogeneizado delicadamente em 1,2 mL de PBS. Um pequeno volume de 5,0  $\mu$ L foi retirado para contagem de concentração espermática. Um volume de 200  $\mu$ L foi retirado para dar origem à amostra controle, e foi congelada à -20°C imediatamente para posteriormente passar por extração de DNA e sexagem por quantificação por PCR em tempo real. O volume restante (1,0 mL) foi dividido em quatro frações (parcelas) de 250  $\mu$ L cada, que foram utilizadas nos procedimentos de separação espermática por sexo realizadas logo em seguida. Seis procedimentos de separação foram realizados, utilizando um total de doze palhetas de sêmen convencional de um mesmo touro.

As palhetas de sêmen sexado fêmea e macho (três palhetas de cada sexo) foram descongeladas e lavadas duas vezes em PBS, como descrito para o sêmen convencional, mas foram feitas individualmente e ressuspendidas em 200  $\mu$ L de PBS ao final do processo de lavagem. Um pequeno volume de 5,0  $\mu$ L foi retirado para contagem de concentração espermática, e o restante foi congelado imediatamente a -20°C, assim como as amostras controle, para análises posteriores.

### *2.2.3 Separação magnética do sêmen pelo sexo*

As quatro parcelas de sêmen, lavadas e diluídas, descritas no item anterior, foram novamente diluídas com 1,0 mL de PBS, em tubos de 2,0 mL. Em cada fração foi adicionada a quantidade 10  $\mu$ L de aptâmeros, equivalente a 1,0 nmol, de um dos aptâmeros A7, B3 e C12, para cada fração (denominadas A, B e C), e 1,0 nmol de cada aptâmero na fração denominada POOL (3,0 nmol de aptâmeros totais). O sêmen com os aptâmeros foi incubado por 30 minutos em agitação leve (Agitador Horizontal, Insight, Brasil), à temperatura ambiente. Após este período, os espermatozoides foram incubados com 10  $\mu$ L de microesferas (chamadas “*beads*”) magnéticas ligadas à estreptavidina (*Micro*

*particles, magnetic, streptavidin coated*, 1  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) por 30 minutos, sob leve agitação, à temperatura ambiente.

Ao fim do período de incubação, os quatro tubos contendo os espermatozoides em solução com aptâmeros e microesferas magnéticas foram colocados em estante magnética (Sigma-Aldrich Inc.) por cinco minutos, e 1,0 mL do sobrenadante foi retirado cuidadosamente de cada amostra, com a ponteira ao lado oposto do tubo com relação ao imã, e foram acondicionados em novos tubos de 1,5 mL identificados, sendo esta primeira fração recuperada chamada de LIVRE (não-retida) dos espermatozoides. O restante do volume presente no fundo do tubo, cerca de 200  $\mu\text{L}$ , foi recuperado e descartado. Os espermatozoides retidos na parede do tubo foram então lavados e recuperados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e transferidos para novos tubos de 1,5 mL identificados, e essa segunda fração recuperada foi chamada de RETIDA.

As amostras da fração livre foram centrifugadas a 1500 x g por cinco minutos, e 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram descartados; os espermatozoides foram ressuspensos por pipetagem, resultando em volume aproximado de 200  $\mu\text{L}$ . Todas amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  logo após dos procedimentos de separação.

Ao final do processo de separação espermática, foram obtidas, para cada amostra, quatro frações de espermatozoides livres (AL, BL, CL, PL) e quatro frações de espermatozoides retidos (AR, BR, CR, PR), além da amostra controle (Cn). Ao total, seis procedimentos de separação magnética do sêmen pelo sexo, e cada separação foi identificada com um número (1 a 6).

#### 2.2.4 Extração e quantificação de DNA

As amostras de espermatozoides foram descongeladas suavemente, à temperatura ambiente, e foram submetidas ao protocolo de extração e purificação do DNA, realizado com o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit®

(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.), com uma pequena alteração, a adição de 5 mM de DTT, DL-Dithiothreitol solution, (Sigma-Aldrich Inc.) à solução de lise. O DTT, assim como o beta-mercaptoetanol, é um potente agente redutor que quebra pontes de bissulfeto, permitindo maior desnaturação das proteínas, como as protaminas presentes nos espermatozoides, obtendo-se maior quantidade de DNA ao final do processo de extração e purificação (GRIFFIN, 2013).

O DNA purificado foi eluído em 100  $\mu$ L de Elution Buffer (fornecido com o kit), e foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.). Alíquotas de 200  $\mu$ L de cada amostra foram preparadas, na concentração de 5 ng de DNA por  $\mu$ L de água ultrapura, para serem utilizadas nas reações de quantificação por PCR em tempo real (qPCR).

Sangue de touro e vaca também foi utilizado, e a extração e purificação do DNA genômico foi realizada com o mesmo kit utilizado para os espermatozoides, como indicado no protocolo do fabricante. Amostras de três animais diferentes foram utilizadas, para cada sexo, e após a quantificação do DNA, foi feita uma diluição com uma mistura igual do DNA dos três animais de cada sexo, na concentração de 5 ng/ $\mu$ L do DNA para utilização nos experimentos a seguir nas reações de qPCR e também para o preparo das amostras utilizadas na curva padrão.

#### *2.2.5 Desenho dos primers*

Um par de primers específico para o cromossomo Y e para o cromossomo X bovinos foi desenhado usando o Primer-Blast (YE et al., 2012), de acordo com os parâmetros para uso em PCR em Tempo Real com SYBR Green. Para o cromossomo X, o par de primers específicos foi desenhado dentro da sequência depositada para o gene da monoamina oxidase A (MAOA) (NCBI Reference Sequence: NM\_181014.2). O par de primers específico para o cromossomo Y foi

desenhado a partir de uma região conservada do gene determinante sexual Y (*SRY*, do inglês “sex-determining region Y”) (acesso no GenBank: EU581861.1). As sequências de nucleotídeos dos primers utilizados estão na Tabela 1.

**Tabela 1** – Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para a quantificação dos genes específicos dos cromossomos sexuais X e Y.

Alvo	Gene	Sentido	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)
X	<i>MAOA</i>	forward	CACGGCTGTTCTATGGGTCA	126
		reverse	TGCCCTGTGGTTTGTGATGT	
Y	<i>SRY</i>	forward	ACTCCTGCAAAAGGAGCATCA	165
		reverse	CGCCTTTGTTAGCGAGAGTAAG	

A eficiência dos primers foi verificada usando-se DNA genômico proveniente de sangue de touro e vaca, em reações com 25 ng de DNA, e os produtos de amplificação dos cromossomos X e Y foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, e também através da observação da curva de dissociação ao final das corridas de qPCR.

#### 2.2.6 Preparação da curva padrão

Para quantificação da proporção entre X e Y das amostras de sêmen separadas magneticamente, uma curva padrão para cada gene foi desenhada, utilizando-se o pool de DNA de sangue de bovinos machos. Foram preparadas seis diluições de DNA genômico, iniciando-se a partir de 125 ng de DNA (em volume de 5,0 µL), diluindo-se cinco vezes a quantidade inicial, até obter-se a sexta diluição com 0,04 ng (em volume de 5µL). Estas quantidades de DNA (de

0,04 ng a 125 ng) compreenderam a quantidade de DNA relativa esperada para cada gene nas amostras do experimento, que utilizaram 25 ng de DNA genômico, e a quantidade de cada gene (X e Y) foi obtida em relação à quantidade relativa de cada gene no momento em que é obtido o Ct (do inglês “curve threshold”), de X e de Y, para cada amostra durante a corrida de qPCR. Por definição, Ct é a interseção entre a curva de amplificação e a linha do “threshold”, e fornece o valor relativo da concentração de um produto da reação de qPCR.

### *2.2.7 Quantificação da proporção X:Y por qPCR em tempo real*

A PCR em tempo real foi realizada em um Stratagene MX3005P qPCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando-se GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA). O DNA foi utilizado em duplicata para cada amostra, e duas reações foram feitas para cada amostra em uma mesma corrida, uma para cada par de primers dos genes alvo. Foi utilizado em cada corrida um controle negativo de DNA (NTC, do inglês “no template control”), e três controles positivos: DNA genômico de sangue bovino fêmea e macho, e também um pool de DNA de todas as amostras de sêmen convencional (controle). As amostras de sêmen e sangue utilizaram a quantidade definida de 25 ng DNA por reação.

O mix de PCR foi feito com 0,5 µM de cada primer e 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corp.), para uma reação de 20 µL de volume final, contendo 5 µL de cada amostra e água livre de nucleases (Invitrogen) q.s.p. 20µL, em Mx3000P Optical Tubes (Agilent Technologies Inc.). A quantidade de DNA foi padronizada para todas as amostras do experimento, sendo 25 ng de DNA adicionado a cada amostra, em duplicata por corrida de qPCR. O protocolo de temperatura utilizada nas corridas foi: um período de dois minutos a 95°C para ativação da enzima, seguida de 40 ciclos de temperatura a 95°C por 15

segundos e 60°C por 60 segundos, para amplificação dos produtos, e a fluorescência do SYBR Green foi tomada ao final de cada ciclo; a corrida foi finalizada com uma curva de dissociação iniciando em 95°C por 15 segundos, depois a temperatura foi abaixada a 65°C, elevando-se novamente a 95°C, variando 1°C a cada 30 segundos, momento em que a fluorescência foi obtida.

#### *2.2.8 Determinação da proporção relativa do gene Y*

A proporção relativa da quantidade de espermatozoides com o cromossomo Y (%Y) em cada amostra foi obtida através da quantidade relativa fornecida pela análise do programa de qPCR ao final das reações, através da fórmula

$$\%Y = ( Y / (X + Y) ) * 100,$$

onde Y é a quantidade relativa do gene Y e X é a quantidade relativa do gene X para a amostra (em duplicata) na mesma corrida de qPCR, referentes à interseção do Ct de cada amostra na curva padrão correspondente ao seu gene alvo (Ct-X e Ct-Y), e os resultados são obtidos em porcentagem.

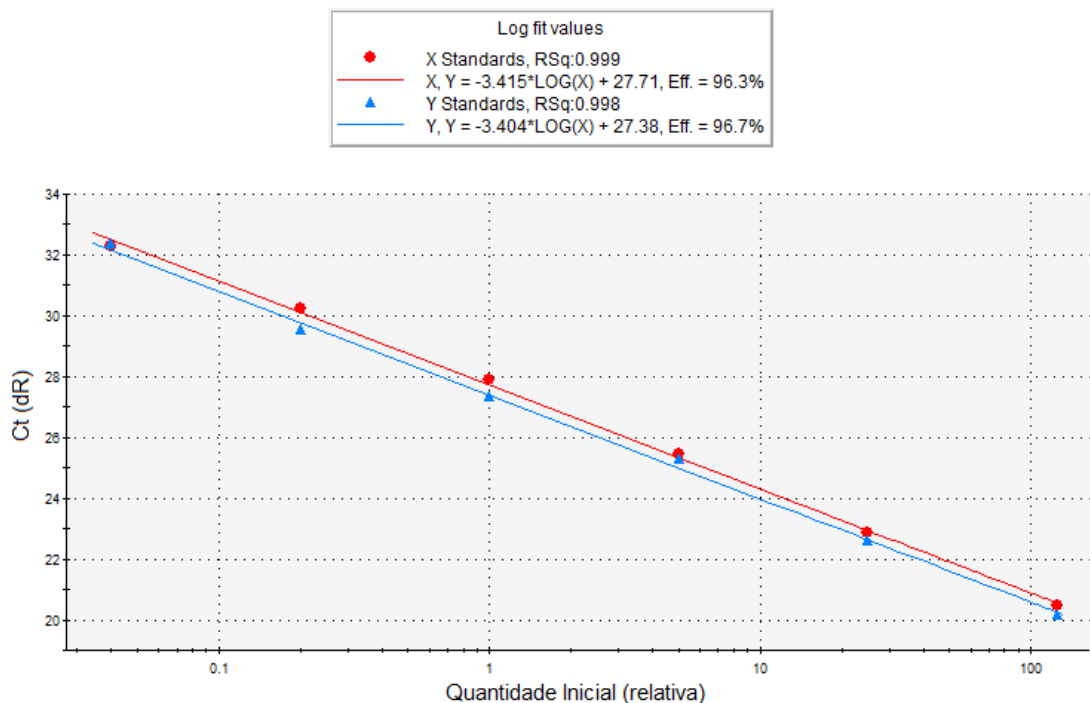
#### *2.2.9 Análise estatística*

Os dados das análises das reações de qPCR foram obtidos através do programa MxPro qPCR System (Agilent Technologies Inc.) e os valores de quantificação relativa foram exportados para planilhas do Excel (Microsoft Corp., USA). Os dados foram analisados com o programa XLStat (XLSTAT 2014, Addinsoft, NY, USA). As amostras foram avaliadas por ANOVA, e o teste de

Tukey foi utilizado para comparação entre as médias dos grupos de separação espermática após a separação magnética a média do grupo controle, e o intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ) foi considerado relevante.

### 2.3 Resultados

A curva padrão utilizada mostrou-se eficiente para a detecção da proporção relativa de espermatozoides Y nas amostras utilizadas ( $r^2 > 0,99$ ; Slope (média) = -3,4278), como pode-se confirmar na comparação com o sêmen convencional utilizado no grupo controle quando comparado com o sêmen comercial sexado fêmea e macho (Figura 1). A proporção de espermatozoides Y encontradas nas amostras de sêmen convencional, sexado fêmea e sexado macho estão na Tabela 2.



**FIGURA 1** – Curva padrão utilizada para a quantificação relativa da proporção de Y e de X nas amostras de sêmen. Legenda: X Standards (●): pontos da curva padrão para o gene X (MAOA); Y Standards (▲): pontos da curva padrão para o gene Y (SRY).



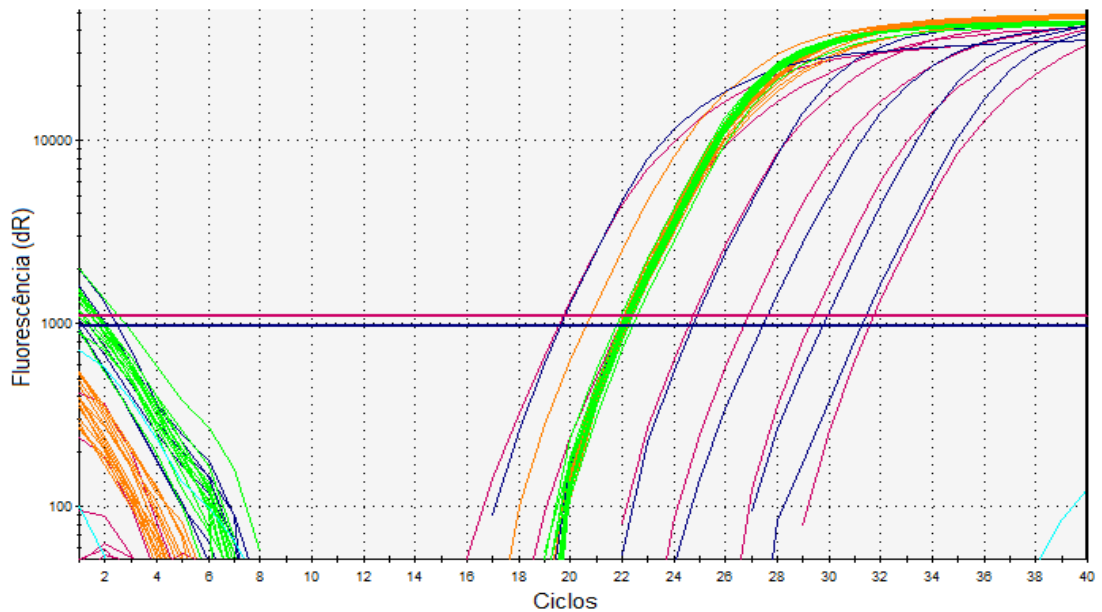
**Tabela 2** – Proporção relativa de espermatozoides com o cromossomo Y do sêmen sexado fêmea e sexado macho, em porcentagem  $\pm$  desvio padrão, com valor de P (teste de Tukey) na comparação com o sêmen convencional (controle).

Grupo	Proporção relativa de Y	P
Controle	51,32% $\pm$ 1,550	-
SF	8,66% $\pm$ 0,837 *	< 0,0001
SM	84,33% $\pm$ 1,070 *	< 0,0001

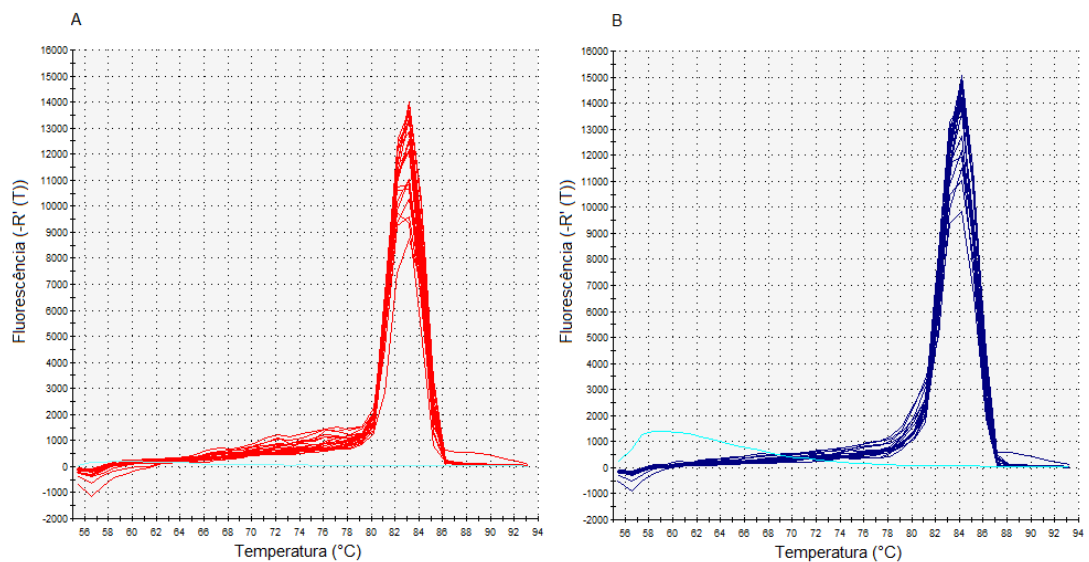
\*: diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; Controle: sêmen bovino convencional não sexado; SF: sêmen bovino sexado fêmea; SM: sêmen bovino sexado macho.

Todas as amostras apresentaram resultados dentro dos valores das curvas padrão, e a quantidade relativa de X e de Y de cada amostra foi obtida em todas as reações automaticamente pelo sistema levando-se em conta o valor de Ct médio entre as duplicatas para os genes de cada amostra (Figura 2). A proporção relativa de Y do sangue de touro, utilizado como controle positivo em todas as reações, foi, em média, 51,04%  $\pm$  0,009, com coeficiente de variação de 1,91% entre as reações. Já a proporção relativa de Y do pool de sêmen convencional, também utilizado como controle positivo em todas as reações, foi de 50,73%  $\pm$  0,010, com coeficiente de variação de 2,01% entre as reações. Não houve amplificação do gene Y nas amostras de sangue de vacas, demonstrando a dos primers desenhados para amplificar um fragmento do gene SRY, específico de animais machos.

A análise da curva de dissociação demonstrou que não houve a produção de produtos inespecíficos ou de primers-dimers (Figura 3). Estes resultados foram confirmados em eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados). Nenhuma das amostras utilizadas como controle negativo (NTC) apresentou produto de amplificação ao final das reações.



**FIGURA 2** – Resultados de fluorescência para a amplificação por qPCR dos genes X e Y das amostras. Legenda: — curva padrão e threshold do gene X; — curva padrão e threshold do gene Y; — amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene X; — amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene Y.



**FIGURA 3** – Curva de dissociação para os produtos de amplificação dos genes X (*MAOA*, A) e Y (*SRY*, B) para as amostras da curva padrão de ambos os genes. Legenda: — amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene X; — amostras de sêmen sexado por aptâmeros, gene Y; — amostras do controle negativo (NTC).

Após a separação magnética dos espermatozoides do sêmen convencional tratados com os aptâmeros, a diferença entre a proporção relativa de espermatozoides com o cromossomo Y (espermatozoides Y) da fração livre do aptâmero C12 foi menor que a do grupo controle ( $P < 0,05$ ), com média de 47,7% contra 51,3%, respectivamente. Os demais grupos de tratamento, tanto nas frações livres quanto nas frações retidas, para os demais aptâmeros ou pool de aptâmeros, não apresentaram diferença significativa na proporção relativa de espermatozoides Y com relação ao grupo controle. As médias da proporção relativa de Y para cada grupo estão na Tabela 3.

**Tabela 3** – Proporção relativa de espermatozoides com o cromossomo Y dos grupos após a separação magnética com os aptâmeros A7, B3, C12 e o pool dos aptâmeros, em porcentagem  $\pm$  desvio padrão, com valor de P, comparado ao sêmen convencional (controle).

Grupo	Proporção relativa de Y	P
Controle	51,32% $\pm$ 1,550	-
A7 livre	51,95% $\pm$ 3,075	0,908
A7 retido	53,63% $\pm$ 2,882	0,301
B3 livre	49,44% $\pm$ 6,498	0,740
B3 retido	50,25% $\pm$ 3,527	0,905
C12 livre	47,75% $\pm$ 1,766 *	0,009
C12 retido	49,64% $\pm$ 1,977	0,257
Pool livre	50,78% $\pm$ 1,694	0,904
Pool retido	52,83% $\pm$ 3,000	0,474

\*: diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

## 2.4 Discussão

Mamíferos machos produzem sêmen em que 50% dos espermatozoides carregam o cromossomo X e 50% carregam o cromossomo Y. Muitas diferenças teóricas entre o espermatozoide X e Y foram sugeridas ao longo do tempo, incluindo as diferenças físicas, tais como tamanho, peso e densidade, velocidade de natação, cargas elétricas superficiais, proteínas de superfície (GARNER; SEIDEL, 2008), mas nenhuma evidência foi encontrada ainda de que estas diferenças possam ser utilizadas para selecionar os espermatozoides, e muitas metodologias desenvolvidas para a separação dos espermatozoides quanto ao cromossomo sexual conforme estas diferenças encontradas ou são de alto custo, ou muito lentas, ou impraticáveis a nível comercial até o momento.

Como dito anteriormente, os aptâmeros utilizados foram desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide que possui o cromossomo Y, e após a separação magnética, esperava-se que estes espermatozoides Y ficassem retidos (fração retida), deixando livres no diluente/meio os espermatozoides com cromossomo X (fração livre).

O resultado deste experimento de separação dos espermatozoides quanto à presença do cromossomo X e Y, utilizando-se os aptâmeros selecionados para essa finalidade, não foi satisfatório, apesar da menor proporção de espermatozoides Y encontrados na fração livre (não retida magneticamente) de um dos aptâmeros testados com relação ao sêmen não sexado, o aptâmero denominado C12 (47,7% vs. 51,3% do controle). A diferença encontrada é muito pequena, e não torna a técnica viável para aplicação em testes de produção de embriões ou de inseminação artificial no momento, pois a proporção entre fêmeas e machos não deve sofrer uma alteração comparada ao sêmen convencional (controle) que seja economicamente importante. A seleção de células por citometria de fluxo, um método eficaz que, apesar das limitações e imperfeições, possui cerca de 90% de precisão na separação dos espermatozoides quanto ao sexo, está comercialmente disponível para o gado

e outras espécies mamíferas (GARNER; SEIDEL, 2008). Em comparação a esta técnica de citometria, mesmo que não haja limitações e prejuízo aos espermatozoides, a seleção dos espermatozoides por aptâmeros, como aqui descrita, se torna inviável com estes resultados obtidos. Mas a possibilidade de haver um enriquecimento de um sexo em uma das frações de espermatozoides após o tratamento com aptâmeros sugere que bons resultados possam ser alcançados e esta técnica pode ser melhorada e empregada num futuro próximo.

Para tentar minimizar as limitações da técnica utilizando a citometria de fluxo, novas técnicas de sexagem do sêmen precisam produzir um fluxo maior de espermatozoides num menor espaço de tempo, com menor lesão mecânica ou por corantes intracelulares menos tóxicos aos espermatozoides (SEIDEL, 2014). Por não utilizar corantes ou marcadores intracelulares, a sexagem com aptâmeros pode, ao atingir bons resultados de separação por sexo, produzir adequados resultados de viabilidade dos espermatozoides, já que o corante Hoechst 33342 e a exposição à radiação ultravioleta são responsáveis por lesões ao DNA dos espermatozoides, embora relatos sobre esses efeitos sejam contraditórios (GARNER, 2009). Os aptâmeros aqui selecionados possuem apenas a capacidade de se ligar a proteínas de superfície, não penetrando nos espermatozoides com membrana intacta, diminuindo a possibilidade de lesão à função da célula ou ao DNA do espermatozoide.

A presença de uma proteína de membrana capaz de distinguir entre espermatozoides portadores de cromossomo X ou Y depende de duas suposições: a primeira, de que a expressão de genes associados ou controlados pelos cromossomos sexuais ocorre em espermátides haploides; e a segunda, de que o produto do gene é confinado ao espermatozoide carregando esse cromossomo (HOWES et al., 1997). Embora os cromossomos sexuais tenham sido considerados, primeiramente, como inativos pela fase de paquíteno da prófase da meiose, há cada vez mais evidências de transcrição pós-meiótica de genes em ambos os cromossomos (LUZI et al., 2003).

Grupos de proteínas específicas do cromossomo X foram identificadas consistentemente em diferentes amostras de sêmen sexado, mas sua ausência

em preparações enriquecidas de membrana plasmática (HOWES et al., 1997) sugere que elas são intracelulares e, portanto, é pouco provável que possam ser utilizadas para proporcionar um marcador útil para a seleção do sexo de espermatozoides vivos. Por muito tempo, buscou-se anticorpos específicos contra o antígeno HY, produzido pelo cromossomo Y (PETER; JONES; ROBINSON, 1993; SOUZA et al., 1999) ou anticorpos para proteínas sexo-específicas produzidas pelo cromossomo X (BLECHER et al., 1999). Bons resultados de produção de anticorpos para separação ou aglutinação dos espermatozoides foram encontrados em algum momento, mas a aplicabilidade desta técnica nunca chegou a ser comprovada na utilização prática cotidiana, apesar de ter gerado algumas patentes (*United States Patent 5,660,997, 6.153.373*) (BENJAMIN et al., 2000; SPAULDING, 1997).

As informações disponíveis sobre a expressão de genes específicos dos cromossomos X e Y e sobre o compartilhamento das proteínas entre as espermátides não fornecem uma resposta conclusiva à questão de saber se espermatozoides X e Y podem diferir quanto a proteínas da membrana plasmática. As diferenças na composição de proteínas entre espermatozoides com cromossomo X e Y pode ocorrer por certos produtos de genes expressos durante a fase haploide, no qual RNA mensageiros são rapidamente traduzidos e codificam proteínas que são transferidos para os sistemas de membrana sem dinâmica de transferência entre as células (HENDRIKSEN, 1999). A dificuldade encontrada neste nosso experimento pode ser explicada pela ausência de proteínas de membrana específicas para cada tipo de espermatozoide. Mas a falta de evidências sobre proteínas diferentes nos espermatozoides X e Y até o momento não é indicativo de que realmente não haja essa diferença. É necessário se levar em consideração que o ponto de partida estes estudos comparativos entre espermatozoides X e Y é a utilização de espermatozoides provenientes de sêmen sexado por citometria de fluxo, cuja precisão não é de 100%, faz com que, em todos os estudos já citados, haja presença do sexo não desejado nas amostras (CARVALHO et al., 2013; HENDRIKSEN, 1999; HOWES

et al., 1997), e os resultados fornecidos por estes estudos não sejam definitivos quanto à comparação entre espermatozoides contendo cromossomo X ou Y.

A descoberta e o desenvolvimento de aptâmeros específicos para os mais diversos fins ainda está no seu início, sendo um campo promissor que pode oferecer uma nova técnica para a sexagem de espermatozoides pelas características únicas dos aptâmeros. Populações de aptâmeros com ligações mais específica para espermatozoides de cada sexo foram selecionadas em estudo descrito anteriormente (COLLEY; BUHR; GOLOVAN, 2008). As populações de aptâmeros específicos para X ou para Y sofreram enriquecimento conforme a passagem dos rounds do SELEX, comprovada pela quantidade de aptâmeros ligados ao sêmen sexado. Neste estudo, a ligação de aptâmeros a espermatozoides suínos foi observada, e estes aptâmeros foram produzidos a partir de espermatozoides bovinos sexados, mostrando a possibilidade de uma ligação cruzada de aptâmeros entre as espécies. Existe uma patente depositada nos Estados Unidos, sobre a produção de aptâmeros com o objetivo de realizar a sexagem de sêmen de mamíferos (OKSENBERG; KRYLOV; MUSHEEV, 2012). Esta patente se refere à produção de um aptâmero, ou um pool de aptâmeros, que se ligam a uma molécula alvo na superfície, acessível através da superfície ou dentro do espermatozoide mamífero, e o método para produzir estes aptâmeros. Apesar da patente descrever a técnica, até o presente momento não foram encontrados estudos realizados comprovando a eficácia desta técnica para a produção de descendentes do sexo desejado, em qualquer espécie.

No nosso estudo, foi utilizada uma concentração aproximada de  $4 \times 10^6$  aptâmeros por espermatozoides (1000  $\mu\text{M}$  para metade de uma palheta de sêmen congelado). Concentrações semelhantes de aptâmeros por espermatozoide foram utilizados em rounds de seleção de aptâmeros (SELEX) em alguns experimentos (COLLEY; BUHR; GOLOVAN, 2008). Como não há a descrição da separação dos espermatozoides quanto à presença dos cromossomos X e Y utilizando-se aptâmeros específicos para esse fim, não podemos chegar à conclusão se a quantidade de aptâmeros no meio com os

espermatozoides foi satisfatória. A concentração de aptâmeros utilizada pode ser muito alta, supersaturando a solução de aptâmeros, o que pode levar a ligações inespecíficas, influenciando negativamente na capacidade de separação dos espermatozoides quanto ao sexo. Da mesma maneira, a quantidade de *beads* magnéticas ligadas à estreptavidina precisa ser melhor investigada, pois a solução pode estar pouco ou muito saturada.

Além dos fatores citados de concentração dos aptâmeros e das *beads* magnéticas, um outro fator que pode interferir na ligação dos aptâmeros com seus alvos é o tempo de exposição com o alvo. Os espermatozoides foram deixados em contato com os aptâmeros, em suave agitação, por 30 minutos numa primeira etapa. Depois da adição das *beads* magnéticas ligadas à estreptavidina ao meio, os espermatozoides ainda tiveram mais 30 minutos de contato com os aptâmeros, propiciando um total de uma hora, em constante e suave agitação, de contato entre a solução de aptâmeros com os espermatozoides. Os protocolos de seleção de aptâmeros com finalidade de sexagem dos espermatozoides descritos apresentam, de uma maneira geral, o mesmo tempo de contato dos aptâmeros com os espermatozoides, apesar do volume utilizado ser menor que o utilizado neste experimento (1,2 mL vs. 0,2 mL). Este tempo utilizado pode ser alterado, com tempo de exposição maior ou menor, e é provável que sejam obtidos resultados diferentes. Se considerarmos o tempo necessário para realizar a sexagem do sêmen com a citometria de fluxo, um tempo de exposição aos aptâmeros maior, como aproximadamente duas horas, ainda pode apresentar vantagens para a sexagem com os aptâmeros, pois os espermatozoides ficariam exposto à possibilidade de danos por manipulação ou pelo ambiente por um tempo relativamente muito menor comparado à citometria de fluxo.

Há, ainda, que se levar em consideração o processo de seleção dos aptâmeros. Como dito anteriormente para os estudos comparativos entre espermatozoides com cromossomos X e Y, ocorre a presença de espermatozoides do sexo não desejado contaminando as amostras, tanto de X quanto de Y, pois a tecnologia de sexagem do sêmen por citometria de fluxo não



possui precisão total. O fato de ter espermatozoides do sexo indesejado nas amostras utilizadas como matéria prima para a seleção dos aptâmeros durante os rounds de SELEX pode fazer com que os aptâmeros selecionados ao fim do processo não sejam específicos para os espermatozoides Y. A seleção/enriquecimento de aptâmeros apresentou uma grande quantidade de sequências com possíveis ligações específicas, e destas foram selecionadas três que foram estudadas por base na quantidade encontrada ao sequenciamento. Apesar destes três aptâmeros biotinilados não terem apresentado os resultados esperados, dentro da grande quantidade de sequências encontradas podem haver aptâmeros que sejam específicos para o espermatozoide Y e possam ser utilizados para a sexagem do sêmen.

A utilização de um novo método para a quantificação da proporção de espermatozoides X e Y em amostras de sêmen, sejam eles convencionais ou sexados, foi eficaz em nossos experimentos. Foram produzidas curvas padrão de alta eficiência com os primers desenhados para os genes específicos dos cromossomos X (*MAOA*) e Y (*SRY*), e com elas foi possível obter a quantidade relativa de células contendo cada um dos cromossomos sexuais. As amostras testadas, de sêmen convencional e de sêmen sexado fêmea e macho apresentaram valores de quantificação relativa dentro dos valores da curva padrão, e através do Ct encontrado para cada amostra foi possível obter a proporção relativa de cada sexo. As proporções de X e Y nas amostras de sangue bovino de macho e de sêmen convencional, em pool, utilizadas como controle positivo dentro de cada corrida de qPCR mostraram baixo desvio padrão e baixo coeficiente de variação, evidenciando que os resultados encontrados foram fiéis ao realmente apresentados por estas amostras (relação 50:50). Estes resultados permitem considerar que os dados de quantificação da proporção relativa de Y encontrados nas amostras de sêmen sexado por aptâmeros testadas podem ser considerados confiáveis e poderão ser repetidos em testes futuros. Além disto, esta técnica de quantificação aqui descrita permite a realização de testes da proporção de sexagem com menor custo, já que não utilizam sondas moleculares, e sim SYBR Green, como marcador de

amplificação, como trabalhos descritos anteriormente (PARATI et al., 2006). Um outro fator que influencia no menor custo desta técnica é que ela dispensa a produção de plasmídeos utilizados na quantificação absoluta em protocolos descritos em diversos trabalhos (MALEKI et al., 2013; PARATI et al., 2006). Novos testes se fazem necessários, mas os resultados encontrados se mostraram confiáveis e podem ser aplicados facilmente, com custo relativamente mais baixo e exigindo menor tempo de preparo e padronização da reação.

## **2.5 Conclusões**

Os aptâmeros selecionados e utilizados neste experimento não produziram o efeito de separação dos espermatozoides conforme a presença do cromossomo X ou Y, nestas condições de concentração de aptâmeros e tempo de exposição aos aptâmeros, mas a diminuição da proporção relativa de Y em uma das separações indica a necessidade de novos testes e novos protocolos.

A curva padrão utilizada para quantificação relativa da proporção dos genes específicos dos cromossomos X e Y mostrou-se eficiente, e pode ser utilizada para facilitar a procedimentos de quantificação da proporção de espermatozoides X e Y de amostras de sêmen bovino convencional e sexado.

## **2.6 Agradecimentos**

Os autores agradecem à Profa. Silvia V. Perri por auxílio com análise dos dados e à Profa. Juliana R. Peiró pelo empréstimo das instalações e dos equipamentos, ambas da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP-Araçatuba, e a toda equipe do Laboratório de Endotoxemia e Enfermidades de

Grandes Animais (LEEGA). Os autores também agradecem à Lagoa da Serra pelo fornecimento do sêmen convencional utilizado, e ao Dr. Gustavo Avelar, da Invitrogen Thermo Fisher, pelo auxílio com material de trabalho.

## 2.7 Referências

- AOKI, S. M.; LOVATO, R. L.; PEITL JUNIOR, P. **Sequências de ácidos nucleicos ou aptâmeros para detecção de componentes de membrana espermática sexo-específicos e suas aplicações em sexagem de sêmen**. INPI-Brasil n. PI 10066390, 08 maio 2012.
- BENJAMIN, T. L.; KOHN, B.; BASKER, C. J.; GEORGE, S.; LIVINGSTON, D. **Method for sex determination of mammalian offspring**. United States Patent n. 6,153,373, 28 novembro 2002.
- BLECHER, S. R.; HOWIE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1309–1321, 1999.
- CARVALHO, J. O.; SILVA, L. P.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Nanoscale differences in the shape and size of X and Y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, e59387, 2013.
- CHEN, X.; ZHU, H.; WU, C.; HAN, W.; HAO, H.; ZHAO, X.; DU, W.; QIN, T.; LIU, Y.; WANG, D. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 59–67, 2012.
- COLLEY, A. J.; BUHR, M. M.; GOLOVAN, S. P. Selection of sex-specific aptamer probes to sperm. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1384, 2008.
- CUI, K. H.; MATTHEWS, C. D. X larger than Y. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 117–118, 1993.
- DE CANIO, M.; SOGGIU, A.; PIRAS, C.; BONIZZI, L.; GALLI, A.; URBANI, A.; RONCADA, P. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 6, p. 1264–1271, 2014.
- ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 818–22, 1990.

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.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Methods in Molecular Biology**, v. 927, p. 279–295, 2013.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A.; JOHNSON, L. A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 312–321, 1983.

GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 886–895, 2008.

GRIFFIN, J. Methods of sperm DNA extraction for genetic and epigenetic studies. **Methods in molecular biology**, v. 927, p. 379–384, 2013.

HENDRIKSEN, P. J. M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1295–1307, 1999.

HERMANN, T.; PATEL, D. J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 820–825, 2000.

HOSSAIN, A. M.; BARIK, S.; KULKARNI, P. M. Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells (spermatids) exposed to different prehybridization treatments. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 119–123, 2001.

HOWES, E. A.; MILLER, N. G.; DOLBY, C.; HUTCHINGS, A.; BUTCHER, G. W.; JONES, R. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 2, p. 195–204, 1997.

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

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. 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, n. 3, p. 203–212, 1987.

LUZI, E.; MINUNNI, M.; TOMBELLI, S.; MASCINI, M. New trends in affinity sensing. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 810–818, 2003.

MALEKI, A. F.; MOUSSAVI, A. H.; NASSIRI, M. R.; TAHMOORESPUR, M.; VAKILI, S. A. Introducing and validation of SYBR Green Real-Time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 1-2, p. 1–6, 2013.

OKSENBERG, D.; KRYLOV, S.; MUSHEEV, M. **Sperm cell separation methods and compositions containing aptamers or nucleic acid sequences for use therein**. United States Patent n. 8.138.319 B. 20 março 2012.

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, n. 9, p. 2202–2209, 2006.

PETER, A. T.; JONES, P. P.; ROBINSON, J. P. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1177–1185, 1993.

SEIDEL, G. E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v. 8, n. Suppl 1, p. 160–164, 2014.

SEIDEL, G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 733–743, 2002.

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

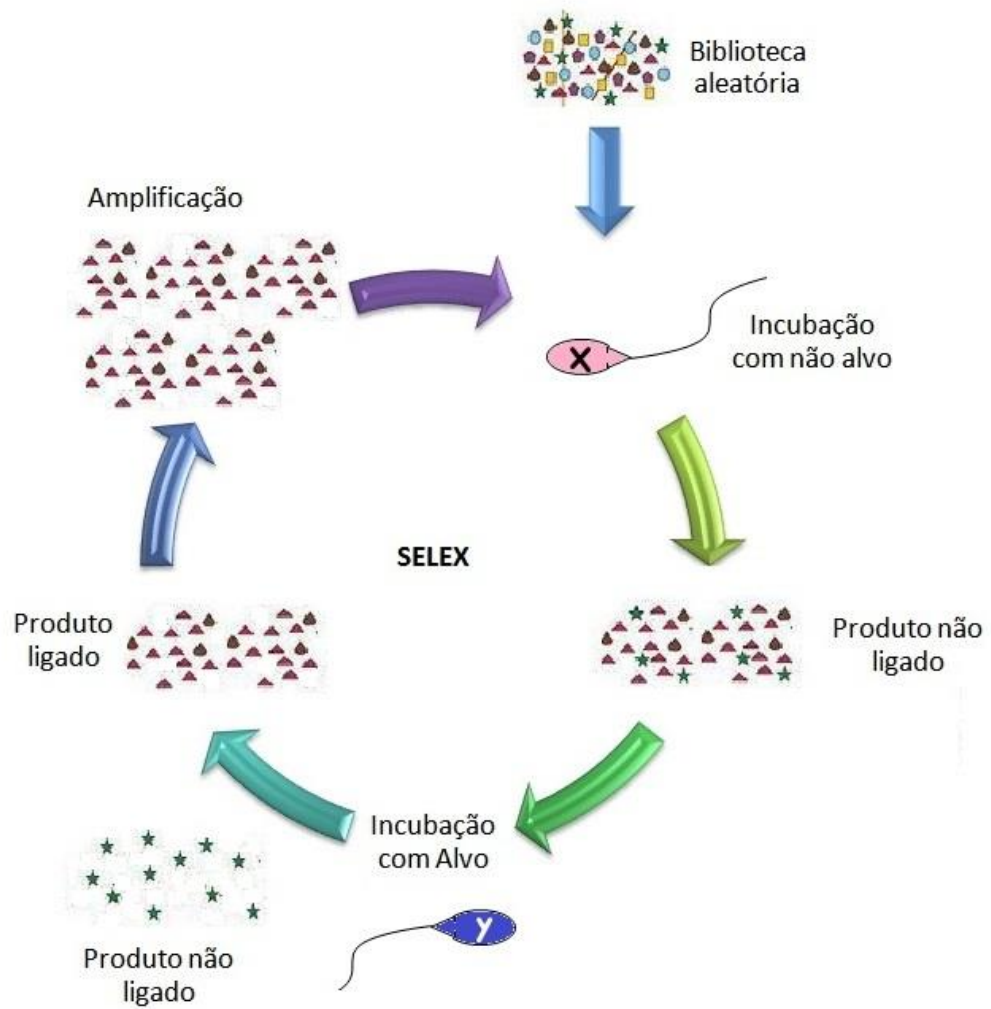
SPAULDING, G. F. **Methods for determining antibodies specific for sex associated sperm membrane proteins**. United States Patents n. 5.660.997. 26 agosto 1997.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 4, p. 381–403, 2007.

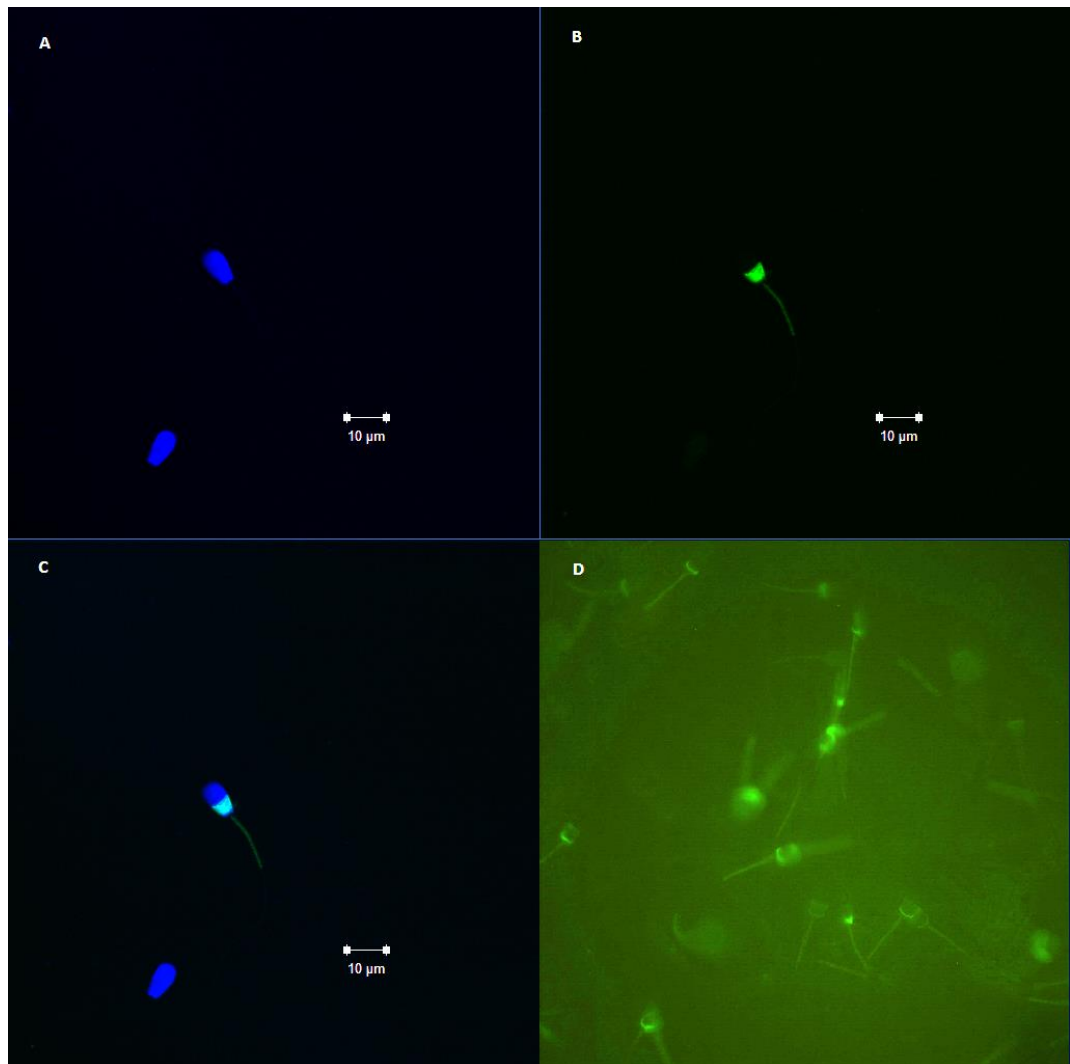
TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 1990.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 134, 2012. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>.

## APÉNDICE



**Figura 1** – Representação esquemática dos ciclos alternados de SELEX para seleção dos aptâmeros (AOKI; LOVATO; PEITL JR, 2012).



**Figura 2** – Visualização de espermatozoides em Microscopia Confocal (A, B e C) e Microscopia Invertida de Fluorescência (D). A: Sêmen convencional descongelado marcado com DAPI visualizado no filtro de emissão para 460 nm. B: Sêmen convencional descongelado marcado com aptâmero B3 Alexa 488 visualizado no filtro para emissão em 517 nm. C: Sobreposição das imagens A e B demonstrando a presença de dois espermatozoides, sendo somente um deles marcado na peça intermediária com Aptâmero B3 Alexa 488. D: Sêmen convencional descongelado marcado com aptâmero B3 Alexa 488 visualizado no filtro para emissão em 517 nm em microscopia de fluorescência, demonstrando maior luminescência na peça intermediária do espermatozoide (AOKI; LOVATO; PEITL JR, 2012).