

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES CANINOS EM GRADIENTE
DESCONTÍNUO DE DENSIDADE: AVALIAÇÃO *IN VITRO***

GABRIELE BARROS MOTHÉ

Botucatu - SP
Outubro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES CANINOS EM GRADIENTE
DESCONTÍNUO DE DENSIDADE: AVALIAÇÃO *IN VITRO***

GABRIELE BARROS MOTHÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu – SP

Outubro 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mothé, Gabriele Barros.

Sexagem de espermatozoides caninos em gradiente
descontínuo de densidade : avaliação *in vitro* / Gabriele
Barros Mothé. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Cão - Sexagem. 2. Biotecnologia animal. 3. Fertilização
in vitro. 4. Espermatozoides.

Palavras-chave: Cão; FICOLL; NYCODENZ; PERCOLL; Separação
espermática .|

Nome do autor: Gabriele Barros Mothé

Título: SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES CANINOS EM GRADIENTE
DESCONTÍNUO DE DENSIDADE: AVALIAÇÃO *IN VITRO*

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ, UNESP,
Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ, UNESP,
Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins

Membro

Teriogenologia de Pequenos Animais, Departamento de Clínicas Veterinárias,
UEL, Londrina/PR

Data da Defesa: 05 de outubro de 2015.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, pelo exemplo de força, garra e perseverança e a minha mãe, a quem devo a inspiração para ser cada vez melhor e quem sabe um dia corresponder a sua importância. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos e por ter permitido encontros tão especiais...

A minha mãe, Gileane Barros, agradecer me parece muito pouco, quando só a eternidade me dará tempo suficiente para tanto. Quando meus nervos insistiram em ser frágeis, você foi força, luz, colo... Obrigada, minha melhor amiga, meu grande amor... com toda redundância, meu grande, grande amor... Obrigada por existir!

Ao meu pai, Carlos Mothé, meu maior incentivador e parceiro, com quem compartilho o amor pelos animais, o respeito por todas as criaturas. Sou o seu reflexo por tudo que me ensinou e não apenas com ensinamentos, mas com exemplos! Amo muito você, garotão! Muito mais do que podem expressar essas palavras.

Aos meus irmãos, Camila e Rafael, e a minha sobrinha Laura, meus maiores afetos. Que bom ter vocês pra abraçar! Minhas referências de carinho e amor, tão triste seria o caminho se eu não tivesse para onde e a quem voltar... Obrigada por serem, sobretudo, este lugar para estar, ser e permanecer, independente de onde eu esteja.

Aos meus avós, Geni, Alcides, Nilda e especialmente ao 'véio' Jonas, exemplo de força e dignidade, perto de você tudo respira alegria. Sou grata a Deus por tê-los em minha vida, apoiando e amando.

A toda a minha família, pelo afeto e parceria, por sempre estar ao meu lado, torcendo junto e vibrando a cada conquista.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Fabiana Ferreira de Souza, toda a minha gratidão, respeito e admiração por ter me ensinado paciente e cuidadosamente tudo que precisei para a realização desse trabalho. Que sorte a minha ter tido a oportunidade de aprender com profissional tão sábia, justa e competente! Você merece todas as honras, risos e alegrias! Muito obrigada por tudo!

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, especialmente aos membros da Banca, com quem pude conviver e aprender com exemplos e ensinamentos que certamente foram e serão importantes por toda minha vida profissional. Meu respeito e gratidão.

A minha grande amiga Carol, parceira desde o início, que me recebeu

de braços abertos e compartilhou comigo momentos de alegria e tristeza. Temos absoluta cumplicidade e tenho certeza que nossa amizade se perdurará para sempre. Por sua causa, a distância da minha família foi suportável, pois tive a sorte de te ter aqui como irmã! Obrigada por tudo, até pelas broncas!

A equipe, Caroline Scott (de novo), Carmen Sicherle, Carlos Renato Guaitolini e Laíza Camargo, pela ajuda incondicional em cada etapa desse trabalho, por me ensinarem sempre e tanto, e terem paciência com meus TOCs e manias. Vocês foram importantes como colaboradores, mas como amigos foram fundamentais. Adoro vocês!

Aos meus amigos, pós-graduandos, Pri, Rúbia, Camila, Paulinha, Carla, Fabi, Fer de Araçatuba, Leda, Guta, Camila Freitas, Camila Malossi, Josi, Yatta, Tarcísio, Diego, Charolês, Lucas, Jorge, Ruffles, Leandro, Gabriel, por terem me acolhido sinceramente desde o princípio e compartilhado comigo tantas alegrias e ensinamentos. Obrigada por todo companheirismo e amizade, nunca vou esquecer vocês!

A dona Raquel por sua dignidade, simpatia e por cuidar de mim com tanto carinho se preocupando com meu excesso de ansiedade e aos funcionários da seção de pós-graduação por me ajudarem nas questões burocráticas e terem paciência com tantas dúvidas e questionamentos.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo nessa luta e não tiveram o nome citado nestas linhas, as minhas desculpas e o meu carinho.

Aos animais, especialmente a Dalila, pela alegria que trazem a minha vida. Afinal, “se eu não fosse veterinária, eu seria veterinária”. Amo incondicionalmente!

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro e por tornarem possível a realização desse trabalho.

“Nós, seremos humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar.”

Chico Xavier

ABREVIATURAS

- ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça (mm)
- ANOVA = análise de variância
- ASH = albumina sérica humana
- BCF = frequência de batimento da cabeça ou batimento flagelar (Hz)
- CASA= computer-Aided Semen Analyzer
- C SPTZ = concentração de espermatozoides recuperada após a centrifugação nos gradientes
- DAPI = 4'-6-diamino-2-fenilindol
- DMA = defeitos espermáticos maiores
- DME = defeitos espermáticos menores
- DMSO = dimetilsulfóxido
- EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESTAT = espermatozoides estáticos (%)
- FISH = ibridização in situ
- FITC-PSA = aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína
- HOECHST = corante bisbenzimidazol
- HMP = alto potencial mitocondrial (%)
- IA = inseminação artificial
- JC-1 = 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide
- LENT = espermatozoides com velocidade lenta (%)
- LIN = coeficiente linear (%)
- LMP = baixo potencial mitocondrial (%)
- M1 = técnica de extração de DNA utilizando fenol:clorofórmio
- M2 = técnica de extração de DNA utilizando fenol:clorofórmio associado ao kit Differex System Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil
- M3 = técnica de extração de DNA utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification, Promega Biotecnologia do Brasil Ltda, Brasil
- M4 = técnica de extração de DNA utilizando o kit comercial IllustraBloodGenomicPrep Mini Spin, GE HealthCare, UK
- MED = espermatozoides com velocidade média (%)
- MMP = médio potencial mitocondrial (%)

- MP = motilidade progressiva (%)
- MPAI = membranas plasmática e acrossomal íntegras (%)
- MPAL = membranas plasmática e acrossomal lesadas (%)
- MPIAL = membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (%)
- MPLAI = membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (%)
- MORF NORM = morfologia normal
- MT = motilidade total (%)
- PBS = tampão fosfato salina
- PER = células que sofreram peroxidação lipídica (%)
- PIV = produção de embrião in vitro
- PVP = polivinilpirrolidona
- qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
- RAP = espermatozoides com velocidade rápida (%)
- SDS = dodecil sulfato de sódio
- STR = média da linearidade da trajetória (%)
- TALP = meio de Tyrode acrescida de albumina, lactato e piruvato
- TRIS = tris (hidrometil) aminometano
- VAP = velocidade média ($\mu\text{m/s}$)
- VCL = velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
- VSL = velocidade linear ($\mu\text{m/s}$)
- X = quantidade de espermatozoides com cromossomo X (%)
- Y = quantidade de espermatozoides com cromossomo Y (%)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico da sexagem espermática	3
2.2. Aplicações da sexagem espermática, aspectos positivos e negativos	5
2.3. Diferenças entre os espermatozoides com o cromossomo X e Y.....	7
2.3.1. Sensibilidade ao pH.....	7
2.3.2. Carga elétrica da superfície da membrana.....	8
2.3.3. Velocidade de migração	8
2.3.4. Antígenos de superfície	8
2.3.5. Diferença no conteúdo de DNA espermático.....	9
2.4. Técnicas de sexagem espermática.....	10
2.4.1. Citometria de fluxo	10
2.4.2. Centrifugação em gradiente de densidade	13
2.5. Métodos de confirmação da sexagem espermática.....	18
2.5.1. Citometria de fluxo	18
2.5.2. FISH – Hibridização in situ por fluorescência	19
2.5.3. Quinacrina mostarda	20
2.5.4. PCR – Reação em cadeia de polimerase.....	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1	1
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 2	40
Resumo.....	56
Contents.....	57
Introdução.....	57
Material e métodos.....	59
Aspectos éticos.....	59
Materiais.....	59
Animais.....	59
Colheita do sêmen.....	59
Avaliação do sêmen fresco.....	60
Preparação do sêmen sexado.....	62
Avaliação da qualidade da amostra após sexagem.....	63
Extração do DNA e PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	64
Análise estatística.....	65
Resultados.....	65
Discussão.....	68
Conclusões.....	72
Referências.....	72

RESUMO

MOTHÉ, G.B. SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES CANINOS EM GRADIENTE DESCONTÍNUO DE DENSIDADE: AVALIAÇÃO *IN VITRO*. Botucatu – SP. 2015. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Apesar da citometria ser um método eficiente para sexagem espermática, nos cães pode ser considerada de difícil aplicação, em vista do alto custo da aplicação da técnica e da baixa recuperação espermática após a separação. Por esta razão, o presente trabalho visou avaliar a viabilidade espermática, a taxa de recuperação e a porcentagem de espermatozoides de cães contendo o cromossomo X ou Y após a centrifugação em três gradientes descontínuos de densidade e estudou três técnicas de extração de DNA espermático para determinar a % de células X ou Y pela PCR quantitativa (qPCR). Foram avaliadas 30 amostras de sêmen canino (10 cães) utilizando os protocolos de centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Percoll[®] - 30 a 90% associado ao Nycodenz[®] e Ficoll). Os espermatozoides foram avaliados pré e pós-centrifugação quanto à motilidade (CASA - Computer-Aided Semen Analyzer), concentração inicial e concentração recuperada, morfologia espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, e função mitocondrial. Após a separação, as células foram submetidas a três protocolos de extração de DNA, um não comercial (fenol:clorofórmio, M1) isolado ou associado a um kit preparatório (M2) e dois comerciais com mini-colunas de extração (M3 e M4) e, posteriormente, à qPCR com os *primers* contra os genes SRY (AF_107021.1) e Fator IX (NM_001003323.2). O protocolo M1 recuperou maior concentração de DNA e com maior qualidade permitindo a execução da qPCR. Dentre os gradientes de densidade, o Ficoll manteve maior qualidade espermática após a centrifugação, embora o enriquecimento de X ou Y não tenha sido observado em nenhum dos métodos estudados. A extração de DNA utilizando o fenol:clorofórmio foi o método que extraiu maior quantidade e de maior qualidade para a aplicação na qPCR.

Palavras-chave: Cão; Ficoll; Percoll[®]; Nycodenz[®]; Separação espermática.

ABSTRACT

MOTHÉ, G.B. SEXING SPERM OF DOG IN DENSITY GRADIENT DISCONTINUOUS: EVALUATION *IN VITRO*. Botucatu – SP. 2015. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Despite cytometry to be an effective method for sperm sexing, in dogs can be considered of difficult application, given the high cost of the technical implementation and low sperm recovery after separation. Therefore, this study aimed to evaluate the sperm viability, recovery rate and the percentage of sperm dogs containing the X or Y after centrifugation three discontinuous density gradients. Furthermore, aimed to study three DNA extraction techniques for sperm cells to determine the percentage of bearing cells of the X or Y chromosome for quantitative real-time PCR (qPCR). Thirty samples (10 dogs) of canine semen were evaluated using centrifugation discontinuous density gradient protocols (Percoll[®] - 30 to 90% associated to Nycodenz[®] and Ficoll). The sperm were evaluated before and after centrifugation for motility (CASA – Computer Aided Semen Analyzer), initial concentration and recovered concentration, sperm morphology, integrity of plasma and acrosomal membranes, and mitochondrial function. After separation, the cells were subjected to three DNA extraction protocols, a non-commercial using phenol:chloroform (M1) alone or combined with a preparatory kit (M2) and two commercial with extraction mini-columns (M3 and M4). Next, the DNA samples were subjected to qPCR using two primers (SRY - AF_107021.1 and Factor IX - NM_001003323.2). M1 protocol recovered greater concentration of DNA with higher quality and allowing the execution of qPCR. Among the density gradients, Ficoll maintained higher sperm quality after centrifugation, although the X or Y enrichment was not observed in any of the studied methods.

Keywords: Canine; Ficoll; Percoll[®]; Nycodenz[®]; Sperm separation.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O interesse pelo mercado de produtos e serviços para animais de estimação tem crescido substancialmente, destacando-se na economia e justificando estudos em todos os segmentos, como em melhorias nas biotecnologias reprodutivas. Dentre estas, a sexagem espermática tem grande destaque na produção animal, mas há na literatura poucos estudos na espécie canina, apesar do interesse de criadores por uma progênie de sexo pré-determinado que dependendo da demanda do mercado por fêmeas ou machos, favoreça a venda desses animais e resulte em maior ganho econômico.

Em outras espécies, especialmente bovinos, várias técnicas já foram testadas para promover a sexagem, baseadas em diferenças entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y, tais como a sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960), a carga elétrica da superfície da membrana (KANEKO et al., 1984), velocidade de migração (WOLF et al., 2008) e antígenos de superfície (KOO et al., 1973). Entretanto, a separação espermática baseada na diferença do conteúdo de DNA é a única validada (PALMA, 2001) e as duas técnicas que se fundamentam nisto são a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (JOHNSON, 1995; JAFAR; FLINT, 1996; JOHNSON, 2000; GARNER, 2006).

A utilização de citometria de fluxo para sexagem espermática tem sido amplamente difundida, devido a sua alta repetibilidade e acuidade, acima de 90% (WELCH; JOHNSON, 1999; JOHNSON et al., 1999; MOCÉ et al., 2006; FREITAS, 2007). No entanto, sua execução demanda equipamentos sofisticados, é muito dispendiosa e tem demonstrado diminuir a fertilidade dos espermatozoides em vista dos danos causados pela técnica (SEIDEL, 2003; TELFORD et al., 2003; CRAN, 2007; GARNER, 2009).

Apesar de ainda não possuir repetibilidade e reprodutibilidade que a torne uma técnica confiável e segura, uma alternativa é a centrifugação em gradiente de densidade devido a simplicidade de execução e por não exigir grandes investimentos em equipamentos (LIZUCA et al., 1987; WANG et al., 1994; LIMA et al., 2011). Esta técnica, se empregada com sucesso, produz descendentes com sexo pré-determinado a baixo custo e pode ser

comercialmente mais acessível do que as demais devido a facilidade de execução. Todavia, mais estudos são necessários, especialmente em cães, que são multíparos e o maior número de descendentes de determinado sexo pode facilitar o mercado.

Baseado nisso, o presente estudo visou responder a hipótese de que a separação das células espermáticas de cães por gradiente descontínuo de densidade pode promover um desvio sexual, com maior proporção de células contendo os cromossomos X ou Y, sem prejuízos a viabilidade celular. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a separação das células espermáticas de cães contendo os cromossomos X ou Y utilizando-se 3 gradientes descontínuos de densidade (Percoll[®], Percoll[®] associado ao Nycodenz[®] e Ficoll); verificar os efeitos da separação sobre a qualidade dos espermatozoides quanto aos parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA (Computer-Aided Semen Analyzer), integridade acrossomal e de membrana, e atividade mitocondrial avaliadas pela citometria de fluxo; e porcentagem de espermatozoides contendo os cromossomos X ou Y pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR) a fim de confirmar a eficiência da separação. Ademais, para viabilizar a técnica de qPCR, o estudo também objetivou a padronização do método de extração de DNA da célula espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da sexagem espermática

A seleção do sexo é uma das tecnologias mais mencionadas na história, porém muito pouco entendida. Esse interesse data de muitos anos, segundo citam Garner e Seidel (2008). Demócrito e a antiga população grega acreditavam que o testículo direito produzia machos e o esquerdo fêmeas, assim, a orquiectomia do testículo esquerdo resultaria no nascimento de apenas filhos homens. Já Aristóteles recomendava uma determinada dieta que a mulher deveria ter e a posição sexual para ter filhos homens (SHENKER, 2002).

Hipócrates (460-377 a.C.) acreditava que a qualidade do sêmen determinava o sexo da criança, com o conceito de que o sêmen “forte” originava um menino, enquanto o “fraco” uma menina (GARNER; SEIDEL, 2008).

A primeira metade do século XX foi marcada por grandes progressos na biologia, especialmente na genética, resultando em importantes descobertas; dentre estas a identificação microscópica dos cromossomos sexuais X e Y, em 1910, sendo um marco para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a sexagem espermática (JOHNSON; SEIDEL, 1999; SEIDEL; GARNER, 2002). Entretanto, foi somente em 1970 que a existência desses cromossomos sexuais em humanos foi confirmada empregando-se o corante quinacrina (SEIDEL; GARNER, 2002).

Acreditava-se que a determinação do sexo dependia somente do cromossomo X, sendo a classificação do macho XO e da fêmea XX. Em 1914, Bridges descobriu que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X com outro morfologicamente distinto, denominando-o de Y (MOTA, 2004). Assim, foram estabelecidos diferentes sistemas sexuais entre os animais que os classificam em macho ou fêmea. Nos mamíferos o macho é o sexo heterogamético, isto é, possui os dois cromossomos sexuais diferentes e por isso é representado por duas letras distintas (XY) e a fêmea dois iguais (XX). Contrariamente, nas aves e cobras, as fêmeas são ZW e os machos ZZ. Há ainda casos de animais que não possuem o sexo heterogamético, como os

insetos que são X0 para os machos e XX para as fêmeas (GRAVES, 2008; ALBERTS et al., 2010). E ainda espécies, como alguns répteis, anfíbios e peixes, que não possuem os cromossomos sexuais definidos, além daqueles que necessitam da influência ambiental (como a temperatura na incubação dos ovos) para que seja definido o sexo da prole (GRAVES, 2008).

Antes da década de 80, os métodos utilizados para sexagem espermática eram precários e imprecisos. Apesar disto, em 1977, Adiomolija et al. já tentavam desenvolver amostras com sexo pré-determinado, a fim de evitar que crianças nascessem com doenças associadas ao cromossomo X. No mesmo ano, Shastry et al. (1977) relataram a sexagem espermática usando um gradiente de Ficoll por sedimentação, e encontraram índice de separação do cromossomo Y de até 70%.

Em 1981, ocorreu o primeiro simpósio sobre aspectos básicos e relevantes da biologia espermática, sendo um dos principais avanços no estudo da biotecnologia do sêmen sexado (AMANN; SEIDEL, 1982).

Próximo a 1982, com o desenvolvimento do citômetro de fluxo, as características cromossômicas, incluindo tamanho, se tornaram mais precisas (PINKEL et al., 1982). Muitas outras diferenças entre os espermatozoides contendo o cromossomo X e Y foram reportadas, como peso e densidade, velocidade de movimento, cargas elétricas e proteínas de superfície, efeitos diferenciais de pH e diferentes efeitos da pressão atmosférica (GARNER, 1984; SEIDEL, 1988; GARNER; SEIDEL, 2008). Entretanto, essas diferenças foram consideradas tão pequenas que seria impossível mensurá-las com exatidão, logo, os espermatozoides foram idênticos em suas características (GARNER; SEIDEL, 2008).

No entanto, Garner et al. (1983) mostraram que a citometria de fluxo era uma abordagem precisa e capaz de determinar a diferença do conteúdo de DNA entre X e Y dos espermatozoides de bovinos, ovinos, suínos e coelhos (GARNER, 2006; SEIDEL, 2007).

Até então, Garner et al. (1983) utilizavam o corante DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) na citometria de fluxo. Mas, este foi substituído a partir de 1987, quando Johnson et al. alteraram o processo de coloração, com a introdução do corante bisbenzimidazol (Hoechst 33342), que atravessa a membrana plasmática íntegra, e, portanto, os espermatozoides mantêm a viabilidade, já

que por esse método a retirada da membrana celular não é necessária, diferentemente da coloração com DAPI. Esta metodologia foi baseada na diferença entre os cromossomos X e Y, uma vez que o cromossomo X é maior, por possuir maior quantidade de DNA que o Y, em mamíferos, sendo a única diferença validada entre tais cromossomos (JOHNSON et al., 1994).

O primeiro nascimento de uma prole de sexo pré-determinado foi relatado em 1989, em coelhos (JOHNSON et al., 1989). Em 2001, a tecnologia foi adaptada para a produção comercial de sêmen bovino (RATH et al., 2009).

Além da citometria de fluxo, outros métodos de separação surgiram em diferentes momentos da história, especialmente a centrifugação em gradiente de densidade, *Swin-up* e marcadores protéicos de superfície celular (KANEKO et al., 1984; PARRISH et al., 1984; LIZUKA et al., 1987; CHECK et al., 1989; LIMA, 2005; WOLF et al., 2008).

2.2. Aplicações da sexagem espermática, aspectos positivos e negativos

Em constante atualização dos seus meios de produção animal, atualmente o Brasil é referência em técnicas laboratoriais desenvolvidas em reprodução e melhoramento genético. O crescente interesse nessas áreas destaca na medicina veterinária melhoria nas biotécnicas reprodutivas. Dentre estas, a pré-seleção do sexo da progênie, mediante manipulação dos espermatozoides ou dos embriões, tem sido alvo de muitos estudos graças ao seu progresso e posterior aplicabilidade.

O sêmen sexado contempla células separadas para conter uma amostra que produzirá uma prole masculina ou feminina para atender às exigências dos criadores de acordo com sua necessidade (FERNANDES; RODRIGUES, 2012; INTERURAL, 2012). Uma vez que seleciona animais com aptidões específicas, que pode ser favorecida por uma progênie de sexo pré-determinado (HOHENBOKEN, 1999), a sexagem espermática beneficia o manejo e a eficiência reprodutiva (MAXWELL et al., 2004; PARRILHA et al., 2005) e maximiza o progresso genético entre gerações (LIMA, 2006; BARUSELLI et al., 2007).

Esta técnica vem sendo utilizada na criação de bovinos (O'BRIEN et al., 2009), mas em cães os relatos são escassos, apesar dessa tecnologia permitir a seleção de um determinado sexo que no caso de espécies múltiparas, como os cães, pode favorecer o mercado.

Além do ponto de vista zootécnico, a sexagem espermática também tem importância na reprodução humana assistida e em animais ameaçados de extinção (SEIDEL; JOHNSON, 1999; LIMA, 2007), pois biotecnologias mais modernas, como a sexagem, podem ser de grande valia na conservação de espécies silvestres, utilizando animais domésticos como modelo experimental (PUKAZHENTH et al., 2006). Recentemente, o sêmen sexado foi empregado em golfinhos para aumentar o número de fêmeas em cativeiro e permitir a reprodução dessa espécie (ROBECK et al., 2013). Ademais, a utilização de inseminação artificial em elefantes e rinocerontes impulsiona o desenvolvimento da sexagem espermática e é de interesse nessas espécies, uma vez que se reproduzem lentamente e o nascimento de mais fêmeas é favorável por diminuir a agressão entre machos e manter uma população mais sustentável (HERMES et al., 2007).

O esperado é que a proporção natural de machos e fêmeas em uma progênie ou rebanho seja de, aproximadamente, 1:1 (CLUTTON-BROCK; IASON, 1986). No entanto, essa estimativa pode variar por razões ainda desconhecidas. Sugere-se que os possíveis responsáveis por essa alteração sejam fatores fisiológicos e ambientais (HARDY, 1997), mas ainda não há confirmação. O emprego do sêmen sexado permite produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas (RATH; JOHNSON, 2008), obter descendentes de animais superiores, elevando em 15% o ganho genético comparado ao sêmen convencional (HOHENBOKEN, 1999; JOHNSON, 2000; WEIGEL, 2004; MOCÉ et al., 2006; DE VRIES et al., 2008).

Na espécie canina não há relatos, mas bovinos resultantes da inseminação artificial (IA) ou produção *in vitro* de embriões (PIV) produzidos com sêmen sexado são morfologicamente normais e não diferem daqueles oriundos do sêmen convencional, incluindo o tempo de gestação, peso ao nascer, taxa de mortalidade e ganho de peso (SEIDEL JR, 2003), e são capazes de se reproduzir em sucessivas gerações (FERNANDES; RODRIGUES, 2012). Além disso, em vista das vantagens da aplicação desta

técnica na espécie bovina, a sexagem espermática tem impulsionado os programas de melhoramento genético e biotécnicas reprodutivas, como a IA e PIV (BARUSELLI et al., 2007).

Em cães, apesar da diferença dos espermatozoides em relação aos de bovinos, a sexagem espermática também já foi realizada com sucesso pela citometria de fluxo, reportando o enriquecimento de 88 a 93% de X e 86 a 93% de Y, mas a concentração espermática recuperada foi baixa, o que inviabilizou a inseminação artificial nessa espécie (OI et al., 2013). A sexagem também já foi realizada por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll® e promoveu o enriquecimento do cromossomo X em comparação aos valores iniciais, mas com valores abaixo do esperado, não sendo possível a sua aplicação comercial, apesar de ter mantido uma quantidade suficiente de espermatozoides para a inseminação artificial (SILVA, 2013).

Logo, para que a sexagem espermática seja viável economicamente nos cães, são necessários estudos para desenvolver uma técnica prática que promova a seleção de células espermáticas contendo os cromossomos X ou Y de forma eficiente e mantenha a quantidade e a fertilidade dos espermatozoides (SEIDEL, 2007).

2.3. Diferenças entre os espermatozoides com o cromossomo X e Y

A separação dos espermatozoides visando a sexagem deve ser baseada em pelo menos uma diferença entre essas células, como a sensibilidade ao pH, a carga elétrica da superfície da membrana, a velocidade de migração e aos antígenos de superfície. Porém, as que são realmente utilizadas atualmente referem-se ao conteúdo de DNA e a consequente diferença na densidade (PALMA, 2001).

2.3.1. Sensibilidade ao pH

Na primeira metade do século XX acreditava-se que os espermatozoides portadores do cromossomo Y sobreviviam com maior facilidade em fluido seminal com pH mais básico, enquanto que o meio ácido da vagina favorecia os portadores do cromossomo X (UNTERBERGER, 1932; EMMENS, 1960).

Em coelhos foi demonstrado que a proporção de machos e fêmeas pode ser influenciada de acordo com o pH da vagina no momento do acasalamento. Nasceram mais fêmeas quando o pH se encontra entre 6,5 a 7,5 e mais machos com o pH entre 7,5 e 8,3 (WAKIM, 1972). Apesar disto, nenhum método é atualmente proposto para separação ou seleção espermática.

2.3.2. Carga elétrica da superfície da membrana

A diferença na carga elétrica da superfície da membrana dos espermatozoides pode permitir a sexagem espermática (KANECO et al., 1984). Em coelhos, os espermatozoides possuem carga elétrica negativa e por eletroforese foi possível separar as células portadoras do cromossomo X e as portadoras do Y, obtendo-se 62% de fêmeas e 25% de machos de coelhos nascidos a partir de inseminação artificial, com espermatozoides que migraram para o anodo ou catodo, respectivamente (GORDON, 1957).

2.3.3. Velocidade de migração

Os espermatozoides portadores do cromossomo X e Y podem ser também separados de acordo com a sua capacidade migratória pela técnica de *Swim-up*. Nesta técnica, as células são incubadas no fundo de um tubo com meio de cultivo a 39°C por um período determinado. Os espermatozoides com motilidade progressiva retilínea ascendem o tubo e compõem o sobrenadante que é extraído (PARRISH et al., 1984). Em humanos foi reportado o nascimento de 81% de meninos após inseminação artificial com espermatozoides preparados por essa técnica (CHECK et al., 1989). Em bovinos, essa proporção foi menor, com o nascimento de 58,45% de machos e 41,55% de fêmeas (WOLF et al., 2008).

2.3.4. Antígenos de superfície

O método imunológico se baseia na determinação de antígenos sexo específicos encontrados na membrana espermática. O antígeno H-Y é um deles e é específico do cromossomo Y. Os epítomos H-Y são pequenos peptídeos de 8 a 11 aminoácidos e representam um grande complexo de moléculas de histocompatibilidade sobre a superfície da célula, permitindo a sexagem dos espermatozoides em larga escala. A técnica é baseada na

ligação de proteínas de superfície a anticorpos específicos anti-espermatozoide Y que culminam na aglutinação das células, promovendo a sexagem espermática (HENDRIKSEN, 1999).

Baseado nessa hipótese, Ali (1987) realizou a sexagem espermática de bovino de acordo com a expressão do antígeno H-Y, tratando-os com anticorpo monoclonal anti H-Y e anticorpo conjugado a um corante fluorescente. Cerca de 8% dos espermatozoides fluorescentes (H-Y positivo), foram portadores do cromossomo Y e 70% dos não fluorescentes do X (H-Y negativo). Além disso, outros estudos relataram acuidade de 98% na separação dos cromossomos X e Y utilizando anticorpos monoclonais anti-H-Y associados à microesferas de polímeros magnetizados (separação magnética) (PETER et al., 1993). Posteriormente, a técnica foi patenteada por Benjamin et al. (US 6,153,373, 28/11/2000).

Hendriksen (1999) analisou por eletroforese o extrato protéico da membrana de espermatozoides X ou Y separados por citometria de fluxo e reportaram insucesso em determinar diferenças entre esses dois tipos celulares. Recentemente, uma proteína 3kDa foi identificada como sexo específica (SANG et al., 2011) e novos estudos tem sido realizados para determinar outras macromoléculas associadas aos espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y.

2.3.5. Diferença no conteúdo de DNA espermático

Apesar das várias técnicas descritas para a separação espermática, somente aquelas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y são comprovadas cientificamente *in vitro* e *in vivo* (JOHNSON, 1995; JAFAR; FLINT, 1996; JOHNSON, 2000; GARNER, 2006).

Os espermatozoides são células haploides e contêm cromossomos autossômicos e cromossomos sexuais X ou Y que determinam o sexo. Em bovinos a sexagem espermática é baseada na quantidade (em média 3,8%, com variação racial entre 4,24% a 3,73%) de DNA contida no cromossomo X (GARNER; SEIDEL JR, 2008). Esta diferença pode ser racial e varia entre as espécies, sendo que nos cães está em torno de 3,9% (GARNER, 2006). Apesar de ser considerada uma pequena diferença, é possível mensurar o

conteúdo de DNA de cada um dos espermatozoides e diferenciá-los em X e Y (SEIDEL, 2007) e, para isto, duas técnicas podem ser usadas, a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (LIMA, 2006; SEIDEL, 2007).

2.4. Técnicas de sexagem espermática

A citometria de fluxo é a técnica de separação espermática que apresenta resultados mais confiáveis e precisos (GRAAF et al., 2009). No entanto, a centrifugação em gradiente de densidade, composto por soluções isotônicas a partir de partículas coloidais, ou componentes iodinatados (LIMA et al., 2003) pode ser uma opção, mas não possui repetibilidade e reprodutibilidade para ser aplicada comercialmente. A vantagem da centrifugação em gradiente de densidade é a simplicidade da técnica e a ausência de grandes investimentos em equipamentos.

2.4.1. Citometria de fluxo

A sexagem espermática baseada na diferença de DNA empregando-se a citometria de fluxo foi um dos principais avanços na biotecnologia da reprodução (BLONDIN et al., 2009).

O citômetro de fluxo foi desenvolvido na década de 80 (PINKEL et al., 1982) e a sexagem utilizando-se esta técnica foi descrita em 1989, no USDA Beltsville Agricultural Research Center (SEIDEL JR et al., 1999; JOHNSON, 2000; GARNER; SEIDEL JR, 2003; WEIGEL, 2004; GARNER, 2006). Apesar de ser o único método de sexagem validado até o momento (GRAAF et al., 2009), somente em bovinos possui desenvolvimento suficiente para sua aplicação comercial (RATH; JOHNSON, 2008).

Nas últimas décadas, os citômetros de fluxo foram aprimorados, sendo essencial para permitir a detecção da diferença de conteúdo de DNA entre os espermatozoides. A principal modificação no equipamento foi a adaptação do tubo de injeção que passou a ter formato triangular e da inclusão de um segundo detector de luz para ampliar a resolução das células espermáticas que são planas (GARNER et al., 1983).

Inicialmente, a sexagem pela citometria de fluxo promovia a morte das

células, uma vez que, para que o núcleo fosse corado com DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) era necessária a remoção da cauda e da membrana celular (PINKEL et al., 1982).

Com o aprimoramento da técnica, o corante DAPI foi substituído pelo Hoechst 33342 (bisbenzimidazol) que atravessa a membrana plasmática íntegra e, portanto, os espermatozoides mantêm sua viabilidade já que por esse método a retirada da membrana celular não é necessária (JOHNSON et al., 1987). O Hoechst 33342 é um corante supravital, o que permite a separação de células não coradas, mortas, levando a um aumento da qualidade da amostra. Porém, apesar de ser o menos tóxico entre os corantes de DNA (JOHNSON et al., 1987), existe a preocupação de que o Hoechst 33342 associado a luz do laser ao qual a célula espermática é exposta possa aumentar a incidência de aberrações cromossômicas (LIBBUS et al., 1987).

A diferença de conteúdo de DNA das células espermáticas é determinada na citometria de fluxo (KLINC; RATH, 2006), assim o espermatozoide X, que tem maior conteúdo de DNA do que Y, também recebe mais corante em seu DNA. O Hoechst 33342 fluoresce quando exposto a uma onda específica de luz emitida pelo laser e então sua fluorescência é medida por um detector e analisada por computador fornecendo uma quantidade exata do conteúdo de DNA (GARNER, 2006), permitindo a diferenciação entre as células. Após todo o processo, os espermatozoides são separados em até 3 grupos, os portadores do cromossomos X, Y e mortos ou não sexados. Para que a técnica seja mais eficiente, somente os espermatozoides do sexo desejado são separados dos demais, isto é, a separação então ocorre em 2 grupos (SVERZUC et al, 2011). Em média, a fração final contém 20% de espermatozoides X, 20% de Y e 60% de danificados ou não sexados (SEIDEL, 2007).

Essa técnica separa os espermatozoides sob alta velocidade (WELCH; JOHNSON, 1999), com eficiência de aproximadamente 90%, podendo variar de 87 a 95% e desde a sua criação aumentou de 30 a 60 vezes a quantidade de células obtidas (WELCH; JOHNSON, 1999; JOHNSON et al., 1999; MOCÉ et al., 2006; FREITAS, 2007), permitindo sua aplicação em diferentes espécies animais. Em humanos a sexagem espermática por citometria de fluxo também é eficaz, no entanto, por questões éticas, religiosas e culturais não é utilizada (STILL et al., 1998).

Apesar da eficácia da técnica, vários fatores podem interferir no sucesso. É o caso da grande variação que existe no conteúdo de DNA entre espécies e até entre raças, aumentando o grau de dificuldade na separação em cada indivíduo. Outro fator que pode dificultar a técnica é o formato da cabeça do espermatozoide, pois cabeças aplanadas e ovais, como de bovinos e ovinos, são mais facilmente orientadas pelo processo hidrodinâmico da técnica do que cabeças arredondadas e angulares, como de humanos e equinos (GARNER, 2006). Apesar da ausência de dados, os espermatozoides dos cães se assemelham aos dos humanos e equinos, com tamanho inferior aos dos bovinos (largura da cabeça: $3,5\mu\text{m}$; área: $20,9\mu\text{m}$, e largura da cabeça: $4,7\mu\text{m}$; área: $34,5\mu\text{m}$, respectivamente) (GARNER, 2006), o que parece dificultar a separação.

Além dos prejuízos celulares causados as células pelo corante e laser, outros fatores são mencionados, como a alta pressão e velocidade, e as diluições sequenciais (SUH; SCHENK, 2003; SUH et al., 2005; GARNER, 2009). Todos esses fatores podem lesar e/ou matar a célula, que então é descartada. De certa forma, o descarte das células mortas e de baixa viabilidade, aumenta a qualidade do sêmen sexado; por outro lado, esse descarte, reduz a concentração de espermatozoides contidos na dose comercializada (2×10^6 células/palhetas) de sêmen sexado bovino, o que pode ter relação com a diminuição da taxa de prenhez quando comparada ao sêmen convencional (15 a 20×10^6 células/palhetas). Embora em bovinos, a comparação de amostras do sêmen convencional e sexado, contendo a mesma concentração espermática (2×10^6), demonstrou taxas de prenhez equivalentes (BODMER et al., 2005).

Outra característica do espermatozoide sexado pela citometria é a capacitação prematura, que é uma desvantagem, especialmente para o que será destinado a congelamento, porém é uma vantagem para o espermatozoide que será utilizado imediatamente para a PIV, sendo desnecessária a indução da capacitação espermática (JOHNSON et al., 1994).

A citometria de fluxo foi mencionada em cães pela primeira vez por Johnson (1992), porém os dados não foram publicados. Recentemente, Oi et al. (2013) descreveram a sexagem utilizando 3 ejaculados de cães e demonstraram ser possível a separação das células espermáticas caninas

contendo os cromossomos X e Y, apesar das diferenças morfológicas dos espermatozoides quando comparados aos de bovino. Este estudo encontrou enriquecimento de 88 a 93% de X e 86 a 93% de Y. A porcentagem de células recuperadas foi menor que 10 a 15%, média mencionada nos bovinos (GARNER; SEIDEL JR, 2003; GARNER, 2006), sendo que dos 200×10^6 de espermatozoides aplicados, apenas 0,3 a 1% foram recuperados. As diferenças entre as espécies justificam os achados e a busca por outras metodologias, já que no cão o ejaculado possui baixa concentração espermática e a inseminação artificial com número restrito de células não é viável, como nos bovinos (SEIDEL JR, 2007). Recomenda-se que a inseminação artificial intravaginal em cães seja realizada com no mínimo 50×10^6 espermatozoides e intrauterina entre 35 e 50×10^6 (WILSON, 1993), concentração espermática obtida apenas quando se usa um pool de vários ejaculados ou quando a concentração espermática é superior a média dos cães, considerando uma recuperação de 0,3 a 1% na citometria de fluxo.

Somada a baixa concentração espermática após a separação por citometria de fluxo, as células espermáticas apresentam redução da motilidade em vista dos danos causados pela técnica (SUH; SCHENK, 2003; SUH et al., 2005; GARNER, 2009). Nos cães, caso fosse pretendida a congelação do sêmen, outros prejuízos seriam encontrados, já que nesta espécie a fisiologia reprodutiva da fêmea, associada a baixa viabilidade das células espermáticas descongeladas, diminuem as taxas de gestação (FLORES et al., 2010).

2.4.2. Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação em gradiente de densidade envolve um processo de centrifugação também baseada na diferença de densidade entre os dois cromossomos (SUMNER; ROBINSON, 1976).

Em bovinos, acredita-se que essa diferença seja de $7 \times 10^{-4} \text{g/cm}^3$ ou 0,06% (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999) e por ser mínima, a sexagem só é possível com a utilização de gradientes com alta resolução de densidade (WINDSOR et al., 1993; VAN MUNSTER et al., 1999a,b).

Os gradientes de densidade podem ser de dois tipos: contínuos ou descontínuos. Nos contínuos, a densidade do gradiente aumenta da parte superior até a parte inferior, não sendo observadas diferenças entre as

camadas; e nos descontínuos, as camadas são observadas e a mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo gradativamente até a parte superior (DENSITY GRADIENT MEDIA, 2003).

A centrifugação em gradiente pode ser realizada com diferentes concentrações em 2 a 12 camadas (CHECK et al., 2000; LIMA et al., 2003; MATÁS et al., 2011), utilizando-se vários tipos de meios, como Albumina Sérica, Ficoll, Ficoll-metrizoato de sódio, Percoll[®] isoladamente ou associado a outros gradientes, como OptiPrep, IxaPrep e Nycoprep[®] (SHASTRY et al., 1977; KANEKO et al., 1983; AMANN, 1989; ANDERSEN; BYSKOV, 1997; CLASSENS et al., 1998; ROSE et al., 1998; MC CANN; CHANTLER, 2000; RESENDE et al., 2009).

O Ficoll é uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade associado ao metrizoato de sódio (SHASTRY et al., 1977).

O Percoll[®] é o mais estudado em animais por separar maior quantidade de espermatozoides com cromossomo X. É composto por sílica coloidal recoberta por polivinilpirrolidona (PVP) e é amplamente utilizado para formação de gradiente, para separação de células, vírus e outras partículas (VICENTE; NADEAU, 1984).

O OptiPrep é um componente iodinado não iônico, estéril e não tóxico, desenvolvido para estudos radiográficos (FORD et al., 1994) e tem vantagens quando comparado ao Percoll[®] na separação de organelas subcelulares, pois é mais denso (FORD et al., 1994; GRAHAM et al., 1994).

Gradiente de albumina sérica bovina já foi utilizada em humanos para obter uma amostra enriquecida com espermatozoides portadores do cromossomo Y e encontrou-se um aumento de 63% (ERICSSON et al., 1973).

Contrariamente, gradientes descontínuos de albumina sérica humana (ASH), contendo duas camadas (10 e 20% de ASH) ou 3 camadas (7,5%, 12,5% e 20% de ASH) já foram utilizados em humanos e resultaram em mais espermatozoides portadores do cromossomo X em ambos, com aproximadamente 52% de enriquecimento (WANG et al., 1994).

Já o Percoll[®] é mais utilizado para obter amostras enriquecidas com espermatozoides contendo cromossomos X, mas pode contaminar e afetar a qualidade da coloração com quinacrina e uma alternativa é a utilização de Ficoll como meio de lavagem para retirada dos resíduos do Percoll[®] (KANEKO

et al., 1983).

Em 1987, Lizuka et al. descreveram a acuidade de 94%, na separação de espermatozoides humanos, utilizando a centrifugação em um gradiente de 12 camadas de Percoll® e o método de confirmação do enriquecimento foi a quinacrina. Posteriormente voluntárias inseminadas engravidaram de bebês do sexo feminino, sem anormalidades. Em 1994, Wang et al. realizaram um trabalho reavaliando o método descrito por Lizuka et al. (1987), utilizando o método de confirmação da separação por hibridização *in situ* (FISH). Estes autores verificaram que a porcentagem de células espermáticas contendo cromossomos X, não ultrapassou os 57,2%, demonstrando que a quinacrina não é um método confiável para avaliar o processo de sexagem.

Blottner et al. (1993) testaram a sexagem espermática de bovinos pela centrifugação em gradiente de Percoll® contendo 10 camadas, com concentrações variando entre 22% a 48%. Estes autores demonstraram enriquecimento de 75% de espermatozoides contendo cromossomos X na última fração do gradiente, confirmado por FISH e nenhuma alteração na morfologia dessas células, mantendo a sua viabilidade.

A centrifugação em gradiente de Percoll® foi comparada ao método *Swin-up* (migração espermática) modificado e demonstrou que o primeiro deve ser o de escolha para enriquecimento de X e o segundo para o enriquecimento de Y (CHECK et al., 1994). Além disso, as células colhidas no fundo do tubo (Percoll® 85%) também contém mais X do que aquelas colhidas na superfície que contém mais Y. Quando foi utilizado um gradiente de Percoll® em oito camadas, a motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X foi aumentada em três vezes (WATKINS et al., 1996), o que também pode contribuir para o maior número de fêmeas nascidas.

Samura et al. (1997) também compararam o Percoll® e *Swin-up*, além do *Glass wool* (que é a separação por lã de vidro), e não observaram diferença significativa em relação a motilidade dos espermatozoides X e Y nos 3 métodos, apenas um aumento sutil da motilidade de X e diminuição de Y quando utilizado o gradiente de Percoll®. No entanto, nenhum desses métodos foi eficaz para a sexagem espermática.

Apesar dos resultados contraditórios a respeito do gradiente de densidade de Percoll®, a capacidade de rolamento dos espermatozoides contendo o

cromossomo Y é reduzida, com redução da fertilidade, resultando em aumento do número de fêmeas geradas pela amostra (LIN et al., 1998).

A associação do gradiente de Percoll[®] contendo 7 densidades e NycoPrep[®] com diferentes concentrações revelou amostras contendo 94% de espermatozoides humanos com cromossomos X, confirmadas por FISH. Os autores concluíram que os resultados poderiam ser comparados a separação por citometria de fluxo (ANDERSEN; BYSKOV, 1997).

Em humanos, apesar dos resultados satisfatórios, tanto na sexagem, quanto na separação de espermatozoides viáveis para procedimentos como a IA e a PIV, o uso de Percoll[®] foi proibido devido aos relatos de endometrite em mulheres que foram inseminadas com sêmen previamente tratado em gradientes compostos por meios coloidais, contendo sílica (MAKKAR et al., 1999), mas em animais não há relatos semelhantes.

A associação de Percoll[®] e OptiPrep[®] mostrou resultados satisfatórios incluindo aqueles relacionados a repetibilidade da técnica (LIMA, 1998; LIMA et al., 2000; LIMA, 2005). Além disso, o IxaPrep (polissacarose eiodixanol) é outra alternativa e surgiu em 1996 para substituir o Percoll[®] e evitar seus efeitos tóxicos sobre os espermatozoides (MC CANN; CHANTLER, 2000), mas ainda hoje também não é utilizado comercialmente.

Em bovinos, o gradiente de Percoll[®] em 12 camadas apresentou acuidade média de 70% e pureza de 81%, aliados a manutenção da capacidade fertilizante das células sexadas, isto é, sem alterações significativas em relação ao sêmen não-sexado. A IA com o sêmen sexado resultou em uma taxa de gestação de 75%, acuidade de 65 a 70%, e taxa de nascimento de fêmeas de 70,7%, utilizando sêmen fresco. Mas o enriquecimento dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y foi confirmado pela coloração com quinacrina mostarda (LIMA et al., 2003), o que conforme Check et al. (2000) não é um método seguro de validação da sexagem.

Também foi observada uma taxa de 80% de espermatozoides bovinos contendo o cromossomo X no sedimento do gradiente de Percoll[®] com 8 camadas, mas esse fato foi relacionado a maior motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X antes da centrifugação e portanto favoreceu a sua sedimentação (KOBAYASHI et al., 2004). Fato este que não foi confirmado por Lima (2005), uma vez que as amostras que apresentaram

maior motilidade antes da centrifugação não foram as mesmas que tiveram maior concentração de espermatozoides contendo o cromossomo X.

Resultados positivos também foram observados na utilização de gradientes de densidade com OptiPrep, que pode ser uma alternativa ao Percoll[®], uma vez que as amostras de sêmen centrifugadas neste gradiente e utilizadas na inseminação artificial de vacas não demonstraram alterações na fertilidade, resultando em taxa de prenhez de 80% (LIMA, 2005). No entanto, estudos posteriores afirmaram que o Percoll[®] como substância formadora de gradiente de densidade tem vantagens quando comparado ao OptiPrep em relação a repetibilidade da técnica, sendo considerado mais confiável (LUCIO, 2007; RESENDE, 2007).

Amostras de sêmen não-sexado descongelados quando submetidas a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®], apresentaram menor acuidade de separação dos espermatozoides X, em torno de 60 a 65%, quando comparadas as amostras de sêmen fresco (LUCIO, 2007; PERINI, 2007; RESENDE, 2007).

Os gradientes de Percoll[®] podem ser preparados em diferentes concentrações e densidades. Até o momento, os gradientes contendo entre 8 e 12 camadas separaram mais espermatozoides com cromossomos X, com acuidade de 75%, provavelmente devido a maior densidade e número de camadas, respectivamente. A coloração com quinacrina foi o método utilizado para confirmar a taxa de enriquecimento de X e há uma patente depositada no Brasil descrevendo a metodologia (LIMA et al., 2003 BRPI0300604-2; LIMA et al., 2011).

Em cães, o método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll[®], na maioria dos estudos, foi descrito para separação de contaminantes celulares do ejaculado, como hemácias e células inflamatórias. Amostras preparadas sobre um gradiente de Percoll[®], nas concentrações de 45 e 90%, e centrifugadas a 400xg por 20 minutos, mantiveram a motilidade espermática e apresentaram considerável taxa de recuperação dos espermatozoides, mas não foi eficaz em separar as células dos contaminantes (PHILLIPS et al., 2012).

Já Silva (2013), utilizando a centrifugação em gradiente de Percoll[®] nas concentrações 90, 85 e 80%, a 560xg, por 30 minutos, reportou diminuição na

qualidade espermática, especialmente a motilidade ($85,3\% \pm 8,3$ versus $40,6\% \pm 22,6$, $p < 0,001$), vigor ($4,5 \pm 0,6$ versus $2,2 \pm 1,1$, $p < 0,001$) e concentração espermática ($133,3 \pm 62,6 \times 10^6$ versus $15,3 \pm 10,1 \times 10^6$ espermatozoides, $p < 0,001$), mas sem alterar a integridade da membrana ($80,8 \pm 8,9$ versus $80,9 \pm 9,5\%$, $p = 0,95$) e a porcentagem de células morfológicamente normais ($66,2 \pm 12,9$ versus $69,5 \pm 14,5\%$, $p = 0,19$). No entanto, a taxa de enriquecimento dos espermatozoides contendo o cromossomo X não foi suficientemente alta para sua aplicação comercial, identificando média de 41,2% de X e 58,8% de Y pré-centrifugação e um aumento ($p = 0,019$) na proporção de X/Y após a centrifugação (49,3% de X e 50,7% de Y) (SILVA, 2013).

Apesar da centrifugação em gradiente de densidade apresentar resultados divergentes e diferentes protocolos, sua utilização é segura, simples e de baixo custo, e para que seja aplicada comercialmente necessita de adaptações e repetibilidade que confirme a sua eficácia. Ademais, embora haja descrições de aproximadamente 70% de nascimentos de fêmeas bovinas após o emprego da técnica, essa taxa ainda é considerada baixa, visto que há a possibilidade de 30% de nascimento de machos, em uma espécie unípara. No entanto, cães são multíparos, e mesmo com o nascimento desta porcentagem de machos, a maioria da ninhada será de fêmeas, favorecendo o mercado, resultando em ganho econômico, já que na maioria das raças caninas, as fêmeas são mais valorizadas.

2.5. Métodos de confirmação da sexagem espermática

Para a avaliação da porcentagem de espermatozoides X e Y em uma amostra e confirmação do enriquecimento de uma dessas células por uma determinada técnica de sexagem espermática, alguns métodos são utilizados como a própria citometria de fluxo, dessa vez para avaliar a ocorrência da separação, além da FISH, da coloração com quinacrina mostarda e da PCR.

2.5.1. Citometria de fluxo

Após a sexagem por citometria de fluxo e envase do material para comercialização, este precisa passar por um teste de pureza que avalia se realmente contém o sexo desejado e o método geralmente usado para

quantificar essa pureza é uma nova análise no citômetro de fluxo (WELCH; JOHNSON, 1999). Essa validação é essencial e é necessário que novas técnicas possam ser aprimoradas (PARATI et al., 2006).

A validação por citometria de fluxo da sexagem espermática segue o mesmo princípio utilizado para a sexagem. Os cromossomos sexuais têm diferentes conteúdos de DNA e a fluorescência emitida por eles é proporcional a essa diferença. Os espermatozoides passam pelo citômetro de fluxo por uma fila única, em alta velocidade e pressão e recebem o laser. Aqueles que contem o cromossomo X emitem um sinal de fluorescência maior do que os que possuem o cromossomo Y, devido ao seu maior conteúdo de DNA (SCHENK et al., 1999; PERGORATO; LIMA, 2001), assim, é possível determinar a pureza da amostra em relação ao enriquecimento.

2.5.2. FISH – Hibridização in situ por fluorescência

A hibridização *in situ*, denominada FISH, é um método que identifica os cromossomos em qualquer tipo celular, de acordo com a sonda utilizada (KOBAYASHI et al., 1999). A FISH, utilizando um corante fluorescente, é capaz de separar os espermatozoides contendo os cromossomos X e Y de acordo com a intensidade de fluorescência que emitem (JOHNSON, 1994) ou a cor quando a sonda utilizada é dupla, identificando sequências gênicas pelo princípio da complementaridade de nucleotídeos do DNA e RNA a partir de sondas de DNA (KOBAYASHI et al., 2004). A marcação específica no cromossomo é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes e para a análise são utilizados sistemas computadorizados (SILVA, 2006).

Essa técnica requer sondas moleculares de sequências completas de genes conhecidos ou fragmentos de DNA, que procuram o gene específico na amostra que está sendo analisada. Existem três tipos de sondas: sonda *painting*, sondas alfa satélites ou sondas de sequência única (SILVA, 2006).

Sonda *painting* determina translocações e deleções e se caracteriza por corar todo o cromossomo, uma vez que é específica para várias regiões de um único cromossomo. Sondas alfa satélite determinam aneuploidias e são compostas por DNA de sequência repetida no centrômero dos cromossomos. E as sondas de sequência única determinam microdeleções e marcam uma região específica do cromossomo (SILVA, 2006).

A FISH, por meio de suas diferentes sondas e princípio da complementariedade de nucleotídeos do DNA, tem sido utilizada principalmente em humanos e ruminantes. A exemplo disso, já foi utilizada para reavaliar o método de coloração com quinacrina na confirmação da sexagem espermática de humanos por centrifugação em gradiente de densidade, e demonstrou que essa coloração, descrita por Lizuka et al. (1987), cuja acuidade havia sido reportada como 94%, não é confiável, uma vez que as células espermáticas contendo cromossomos X ao serem reavaliadas pelo método FISH tiveram porcentagem inferior a 57,2% (WANG et al., 1994).

Blottner et al. (1993) e Andersen e Byscov (1997) também utilizaram a FISH para confirmar o enriquecimento de espermatozoides contendo cromossomos X após sexagem pelo método de centrifugação em gradiente de densidade, e Vidal et al. (1993) pelo método de gradientes de albumina, demonstrando que a técnica FISH é interessante como método de validação da sexagem espermática e pode ser considerada confiável (RENS et al., 2001).

A FISH pode apresentar vantagens em relação a PCR e a coloração com quinacrina, pois como utiliza sondas específicas de DNA dos cromossomos os resultados são mais confiáveis; os espermatozoides são analisados individualmente e não em grupos; e vários espermatozoides podem ser marcados de forma rápida e precisa (FLAHERTY; MATTEWS, 1996).

Porém, essa técnica ainda é muito trabalhosa e dispendiosa (RENS et al., 2001). Além disso, quando apenas uma sonda é utilizada, alguns espermatozoides exibem sinal de hibridização, mas há aqueles que não apresentam sinal algum, e então se pressupõe que estes são portadores do outro cromossomo. No entanto, essa suposição é inaceitável, uma vez que os espermatozoides podem não ser corados por várias razões, como a falha na hibridização ou presença de cromossomos aneuploides. Para resultados mais confiáveis, devem ser usadas colorações duplas, ou até triplas, encarecendo e aumentando o grau de dificuldade do procedimento (FLAHERTY; MATTEWS, 1996).

2.5.3. Quinacrina mostarda

A quinacrina é um método que cora o corpúsculo F do cromossomo Y, o qual se encontra na região distal do seu braço curto. Em 1988, a partir dessa

coloração, foi demonstrada a presença do corpúsculo F (identificado como corpúsculo fluorescente) em diversas espécies, como bovinos, suínos, leporinos, murinos, cães, ratos e também no homem (OGAWA et al., 1988).

No entanto, a quinacrina pode produzir resultados falsos positivos e falsos negativos em células em interfase (THOMSEN; NIEBUHR, 1986), sendo demonstrado em vários estudos em humanos que essa técnica pode produzir resultados enganosos e imprecisos.

Vale ressaltar então que os resultados de trabalhos que utilizaram a coloração com quinacrina para confirmar a sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll[®] devem ser interpretados com cautela, uma vez que a quinacrina pode falsamente aumentar o enriquecimento de X, e diminuir o de Y, apresentando resultado incorreto, já que não foi confirmado pela PCR ou pela FISH (CHECK et al., 2000). O Percoll[®] é considerado um contaminante, interferindo no processo de coloração. Nestes casos, o Ficoll pode ser utilizado como um meio para lavagem e retirada dos resíduos de Percoll[®], mas estes achados não foram confirmados (KANEKO et al., 1983).

Além disso, existe alto desvio padrão da técnica de coloração, podendo alcançar 16,4% (ISHIJIMA et al., 1991; BLOTTNER et al., 1992), influência dos meios contendo Percoll[®] ou albumina, utilizados na centrifugação em gradiente de densidade, e que resultam em coloração inespecífica dos cromossomos autossômicos, não corando apenas o cromossomo Y, conforme desejado (VAN KOOIJ; VAN OOST, 1992). Lin et al. (1998) também descreveram a ineficiência da quinacrina como método de marcação do cromossomo Y. Assim como Han et al. (1993) que ao utilizar FISH não encontraram enriquecimento de espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y pelo método de sexagem *Swin-up*, que antes havia sido confirmado por Check e Katsoff (1993), demonstrando a falta de confiabilidade da técnica.

Diante disso, o método de separação por gradiente descontínuo de Percoll[®] e outros que utilizaram a coloração com quinacrina como indicador da separação devem ser estudados melhor, considerando os resultados imprecisos e equivocados dessa técnica (CHECK et al., 2000).

2.5.4. PCR – Reação em cadeia de polimerase

A validação da sexagem espermática requer procedimentos seguros e

confiáveis. A PCR permite a replicação do DNA *in vitro* e a amplificação de sequências específicas com alta sensibilidade e especificidade (BUENO, 2004). A PCR convencional pode quantificar a relação de cromossomo X e Y em uma amostra de sêmen. No entanto, em diferentes lotes de sêmen não sexado de um mesmo reprodutor foi reportada grande variação, o que a caracterizou como uma técnica instável e insegura (CHANDLER et al., 1998; CHANDLER et al., 2002). Mas, o desenvolvimento de nova modalidade, a PCR em tempo real ou quantitativa, restaurou sua confiabilidade, uma vez que, a utilização de sondas fluorescentes, possibilita estudos qualitativos e quantitativos, reportados com alto grau de acurácia, repetibilidade e reprodutibilidade (JOERG et al., 2004; PARATI et al., 2006). Em estudo realizado em bovinos não demonstrou diferença significativa quando comparada a citometria de fluxo (PARATI et al., 2006).

Além disso, têm as vantagens de permitir a utilização de uma pequena alíquota, o que no caso do sêmen, especialmente de cão, que conta com pequeno volume, é de interesse; além de poder ser feita em grande escala e não precisar de um equipamento de citometria de fluxo, que é a forma de confirmação mais utilizada (SVERZUC, 2011).

Entretanto, para que a PCR seja empregada eficientemente, é necessária a extração de DNA das amostras em quantidade suficiente e qualidade apropriada, que é a primeira e primordial etapa dessa técnica (BAREA et al., 2004; COELHO, 2004).

A extração de DNA pode ser realizada por diversos métodos, mas ainda existem muitos problemas como contaminação por DNA estranho, inibidores da PCR e fragilidade do DNA (COELHO et al., 2004). Por estes motivos, um método de extração eficiente, livre de inibidores e íntegro é imprescindível para que seja possível a utilização na PCR e em outras técnicas moleculares, salientando a necessidade de melhorias e desenvolvimento de novos protocolos de extração, principalmente de amostras de sêmen, que devido a sua natureza, conta com forte condensação da cromatina em seu núcleo, dificultando sobremaneira a extração.

REFERÊNCIAS*

ADIMOELJA, A., HARIADI, R., AMITABA, I. G. B., ADISETYA, P., SOEHARNO. The separation of X- and Y-spermatozoa with regard to the possible clinical application by means of artificial insemination. **Andrologia**, v. 9, n. 3, p. 289-292, 1977.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 613p.

ALI, J.I. Enrichment of bovine X and Y-chromosome bearing sperm with monoclonal H-Y antibody fluorescence activated cell sorter. **Archives of Andrology**, v. 24, n. 3, p. 235-245, 1990.

AMANN, R. P, SEIDEL JR, G.E. Prospects for sexing mammalian sperm. Colorado Associated University Press, 1982. 288p.

AMANN, R. P. Treatment of sperm to determine sex. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 4961, 1989.

ANDERSEN, C.Y., BYSKOV, A.G. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. **Acta Obstetrician et Gynecologica Scandinavica**, v. 76, p. 131-134, 1997.

BAREA, J.A., PARDINI, M.I.M.C., GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia de Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BARUSELLI, P.S., SOUZA, A.H., MARTINS, C.M., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S., AYRES, H., ANDRADE, A.F.C., RAPHAEL, C.F., ARRUDA, R.P.

* De acordo com ABNT (Associação Nacional de Normas Técnicas) – NBR 6023, Agosto /2002.

Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 374-381, 2007.

BERARDINO, D.D., VOZDOVA, M., KUBICKOVA, S., CERNOHORSKA, H., COPPOLA, G., COPPOLA, G., ENNE, G. Sexing river buffalo (*Bubalus bubalis* L.), sheep (*Ovis Áries* L.), goat (*Capra hircus* L.), and cattle spermatozoa by Double color FISH using bovine (*Bos taurus* L.) X- and Y-painting probes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 1, p. 108-115, 2004.

BLONDIN, P., BEAULIEU, M., FOURNIER, V., MORIN, N., CRAWFORD, L., MADAN, P., KING, W.A.P. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.

BLOTTNER, S., PITRA, C., BERGER, U. Y-chromosome-specific fluorescence (f-body) of poorly decondensed bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 24, n. 5, p. 255-259, 1992.

BLOTTNER, S., SCHWERIN, M., BÖTTCHER, M., PITRA, C. Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll™ density gradient. **Archives Tierzucht**, v. 36, n. 2, p. 153-62, 1993.

BODMER, M., JANETT, F., HÄSSIG, M., REICHERT, P., THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1647-1655, 2005.

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 233-234, 2004.

CHANDLER, J.E., STEINHOLT-CHENEVERT, H.C., ADKINSON, R.W., MOSER, E.B. Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving and farrowing records. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1855-1867, 1998.

CHANDLER, J.E., WILSON, M.P., CANAL, A.M., STEINHOLT-CHENEVERT,

H.C. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1021-1034, 1999.

CHANDLER, J.E., CANAL, A.M., PAUL, J.B., MOSER, E.B. Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates. **Theriogenology**, v. 57, p. 1327-1346, 2002.

CHECK, J.H., SHANIS, B., COOPER, S., BOLLENDORF, A. Male sex preselection following swim-up technique and insemination in women treated with ovulation inducing drugs. **Archives of Andrology**, v. 23, p. 165-166, 1989.

CHECK, H., KWIRENK, D., KATSOFF, D., PRESS, M., BREEN, E., BAKER, A. Male: female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus Percoll™ preparation of inseminated sperm. **Archives of Andrology**, v. 33, p. 63-65, 1994.

CHECK, M.L., BOLLENDORF, A., CHECK, J.H., HOURANI, W., LONG, R., McMONAGLE, K. Separation of sperm through a 12-layer Percoll™ column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. **Archives of Andrology**, v. 44, p. 47-50, 2000.

CLAASSENS, O. E., MENKVELD, R., HARRISON, K. L. Evaluation of three substitutes for Percoll™ in sperm isolation by density gradient centrifugation. **Human Reproduction**, v. 13, n. 11, p. 3139–3143, 1998.

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

COELHO, E.G.A., OLIVEIRA, D.A.A., TEIXEIRA, C.S., SAMPAIO, I.B.M., RODRIGUES, S.G., ALVES, C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.

CRAN, D.G. XY sperm separation and use in artificial insemination and other **ARTs. Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 475-491, 2007.

DENSITY GRADIENT MEDIA. Applications and products Axis-Shield.4 ed. Norway, 2003.

DE VRIES, A., OVERTON, M., FETROW, J., LESLIE, K., EICKER, S., ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 847-856, 2008.

EMMENS, C.W. Insemination pH and the sex ratio in rabbits. **Journal of Heredity**, v. 51, p. 156-157, 1960.

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

FERNANDES, J.R.C., RODRIGUES, P. Sexagem de sêmen. **Agrotec Revista Técnico-Científica Agrícola**, v. 4, p. 28-30, 2012.

FLORES, J.A, FERNANDEZ, V.A., HUAMAN, H.U., RUIZ, L.G., SANTINI, A. Refrigeración de sêmen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar La supervivência espermática. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 21, n. 1, p. 26-34, 2010.

FORD, T., GRAHAM, J., RICKWOOD, D. Iodixanol: A nonionic isoosmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. **Analytical Biochemistry**, v. 220, n. 2, p. 360-366, 1994.

FREITAS, C.P. Variações Metodológicas na Congelação de Sêmen Bovino Sexado. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, 2007.

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 cytometric. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 312-321, 1983.

GARNER, D.L., SEIDEL Jr, G.E. Past, present and future perspectives on sexing sperm. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 375-384, 2003.

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

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

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

GORDON, M.J. Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 43, p. 913-918, 1957.

GRAAF, S.P., BEILBY, K.H., UNDERWOOD, S.L., EVANS, G., MAXWELL, W.M. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. **Theriogenology**, v. 71, p. 89-97, 2009.

GRAHAM, J., FORD, T., RICKWOOD, D. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of Iodixanol. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 367, 1994.

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

HARDY, I.C.M. Possible factors influencing vertebrate sex ratio: an introductory

overview. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 51, p. 217-241, 1997.

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

HERMES, R., GORITZ, F., STREICH, W.J., HILDEBRANDT, T.B. Assisted reproduction in female rhinoceros and elephants – Current status and future perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42 (suppl 2), p. 33-44, 2007.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1421-1433, 1999.

ISHIJIMA, S.A., OKUNO, M., MOHRI, H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 340-347, 1991.

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

JOERG, H., ASAI, M., GRAPHODATSKAYA, D., JANETT, F., STRANZINGER, G. Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 121, p. 209–215, 2004.

JOHNSON, L.A., PINKEL, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. **Cytometry**, v. 7, p. 268–273, 1986.

JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P., LOOK, M. V., PINKEL, D. Flow sorting X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. **Gamete**, v. 16, p. 1-9, 1987.

JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P., HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits live births from X- and Y-sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of**

Reproduction, v. 41, p. 199-203, 1989.

JOHNSON, L.A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 8-18, 1992.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 16, p. 303-326, 1994.

JOHNSON, L. A., CRAN, D. G., POLGE, C. Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- & Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 51-56, 1994.

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

JOHNSON, L. A., WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X- and Y-sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v. 53, p. 1323-1413, 1999.

JOHNSON, L. A., SEIDEL Jr, G. E. Current status of sexing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1267-1484, 1999.

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

KANEKO, S., YAMAGUCHI, J., KOBAYASHI, T., LIZUKA, 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.

KANEKO, S., OSHIO, S., KOBAYASHI, T., MOHRI, H., LIZUKA, R. Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll® density gradients. **Biomed Research**, v. 5, p. 187-194, 1984.

KLINC, P., RATH, D. Application of flow cytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: a review, **Archives Tierzucht**, v. 49, n. 1, p. 41-54, 2006.

KOBAYASHI, M., TAKEZAWA, S., HARA, K., YU, R.T., UMESONO, Y., AGATA, K., TANIWAKI, M., YASUDA, K., UMESONO, K. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 4814–4819, 1999.

KOBAYASHI, J., OGURO, H., UCHIDA, H., KOHSAKA, T., SASADA, H., SATO, E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll[®] gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 463-469, 2004.

KOO, G.C., STACKPOLE, C.W., BOYSE, E.A., HAMMERLING, U. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Production National Academy Science**, v. 70, p. 1502-1505, 1973

LIBBUS, B. L., PERREAULT, S. D., JOHNSON, L. A., PINKEL, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoescht 33342 and UV laser irradiated during flow sorting. **Mutation Research**, v. 182, p. 265-274, 1987.

LIMA, V.F.M.H. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade. 1998. 89f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

LIMA, V.F.M.H., RAMALHO, M.D.T., RODRIGUES, L.H., MALHEIROS, E.B., MOREIRA-FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll[®] density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

LIMA, V. F. M. H., MOREIRA FILHO, C. A., RAMALHO, M. F. P. D. T. **Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado**. 17 junho, 2003; FAPESP/UNESP/USPBR PI 0300604-2 (Brasil).

LIMA, V.F.M.H. **Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 2005. 214f. Tese (Livre Docência) -Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

LIMA, V.F.M.H., Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 213-224, 2006.

LIMA, V. F. M. H. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia - Suplemento**, v. 36, p. 219-228, 2007.

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

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

LIZUKA, R., KANEKO, S., AOKI, R., KOBAYASHI, T. Sexing of human sperm by discontinuous Percoll™ density gradient and its clinical application. **Human Reproduction**, v. 7, p. 573-575, 1987.

LUCIO, A. C. **Influência do método de separação dos espermatozoides viáveis (“swim up”) na eficiência de seleção do sexo de bovinos por**

gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal. 2007, 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MAKKAR, G., NG, H.Y., YEUNG, S. B., HO, P. C. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 796–802, 1999.

MARQUEZI, D. Algo de novo no reino dos humanos. **Galileu**, v. 197, p. 41-53, 2007.

MATÁS, C., VIEIRA, L., VASQUEZ, G. F. A., LÓPEZ, A. K., ÚBEDA, L. R., GADEA, J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll™ gradients on boar sperm function. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 62–72, 2011.

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

MC CANN, C. T., CHANTLER, E. Properties of sperm separated using Percoll™ and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 205–209, 2000.

MOCE, E., GRAHAM, J. K., SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929–936, 2006.

MOTA, A.V. **Sexagem de espermatozoides em mamíferos domésticos.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

O'BRIEN, J. K., STEINMAN, K. J., ROBECK, T. R. Application of sperm sorting and associate reproduction technology for wildlife management and conservation. **Theriogenology**, v. 71, p. 1330-1331, 2009.

OGAWA, S., YAMAKAWA, H., YAMANOI, J., NISHIDA, S., KANO, Y., TAKESHIMA, T., TAUCHI, K., NAGASHIMA, H. Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species? **Theriogenology**, v. 239, n. 5, p. 1083-1089, 1988

OI, M., YAMADA, K., HAYAKAWA, H., SUZUKI, H. Sexing of dog sperm by fluorescence in situ hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 92-96, 2013.

PALMA, G.A. **Biotechnologia de la reproduccion**. Argentina, El Paraíso, 1ed, p. 318-385, 2001.

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

PARRILLA, I., VASQUEZ, J.M., GIL, M.A., CABALLERO, I., ALMINANA, C., ROCA, J., MARTINEZ, E.A. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 86-98, 2005.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., FIRST, N.L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 112, 1984.

PEERGORATO, L.M.C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.L. Selección del sexo em mamíferos. In: PALMA, G.A. **Biotechnologia de La reproduction**. 1ed. Inta: Balcarce, p. 317-351, 2001.

PERINI, A.P. **Separação de espermatozoides “X” viáveis, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na produção in vitro de embriões destinados a criopreservação** (Dissertação de Mestrado). Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.2007.

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 HY antigen. **Theriogenology**, 1993.

PHILLIPS, T. C., DHALIWAL, G. K., VERSTEGEN-ONCLIN, K. M., VERSTEGEN, J. P. Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. **Theriogenology**, v. 77, p. 39-45, 2012.

PINKEL, D., LAKE, S., GLEDHILL, B. L., VAN DILLA, M.A, STEPHENSON, D., WATCHMAKER, G. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. **Cytometry**, v. 3, p. 1–9, 1982.

PUKAZHENTHI, B., COMIZZOLI, P., TRAVIS, A.J., WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 77–90. 2006.

RATH, D., JOHNSON, L.A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 338-346, 2008.

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

RENS, W., YANG, F., WELCH, G., REVELL, S., O'BRIEN, P.C., SOLANKY, N., JOHNSON, L.A., FERGUSON SMITH, M.A. An X-Y paint set and sperm FISH

protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. **Reproduction**, v. 121, p. 541-546, 2001.

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

RESENDE, M.V., BEZERRA, M.B., PERECIN, F., ALMEIDA, A.O., LUCIO, A.C., LIMA, V.F.M.H. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll™ and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 581-587, 2009.

ROBECK, T. R., MONTANO, G. A., STEINMAN, K. J., SMOLENSKY, P., SWEENEY, J., OSBORN, S., O'BRIEN, J. K. Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 168-181, 2013.

ROSE, G.A., WONG, A. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of albumin column method of sperm separation for sex selection. **Human Reproduction**, v. 13, p. 146-149, 1998.

SAMURA, O., MAHARU, N., HE, H., OKAMOTO, E., OHAMA, K. Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. **Human Reproduction**, v. 12, n. 11, p. 2437-2442, 1997.

SANG, L., YANG, W.C., HAN, L., LIANG, A.X., HUA, G.H., XIONG, J.J., HUO, L.J., YANG, L.G. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2060-2070, 2011.

SCHENK, J.L., SUH, T.K., CRAN, D.G., SEIDEL, Jr. G. E. Cryopreservation of

flow sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375–91, 1999.

SEIDEL JR, G.E. **Sexing mammalian sperm and embryos**. Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988.

SEIDEL Jr., 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, p. 1407- 1420, 1999.

SEIDEL Jr, G.E., JOHNSON, L.A. Sexing Mammalian Sperm – Overview. **Theriogenology**, v. 52, n. 8,p. 1267-1272, 1999.

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

SEIDEL Jr, G.E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3-4, p. 145-156, 2003.

SEIDEL Jr, G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 443–446, 2007.

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

SHENKER, J.G. Gender selection: Cultural and religious perspectives. **Journal of Assisted Reproduction in Genetics**, v. 19, n. 9, p. 400-410, 2002.

SILVA, P.F.N., GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SILVA, C.B.A.R. **Sexagem espermática por gradiente de densidade de**

Percoll® em cães. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Franca, 2013.

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

SUH, T.K., SCHENK, J.L. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. **Theriogenology**, v. 59, p. 516, 2003.

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

SUMNER, A.T., ROBINSON, J.A., A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, n. 1, p. 9-15, 1976.

SVERZUT, V.G. **Determinação da porcentagem de espermatozoides portadores de cromossomo X e Y no sêmen sexado mediante PCR em tempo real.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

TELFORD, D.J., BEARD, A.P., FRANKS, J.R. The potential adoption and use of sexed semen in UK suckler beef production. **Livestock Production Science**, v. 84, p. 39-51, 2003.

UNTERBERGER, F. Sex determination and hydrogen ion concentration. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 58, p. 729-731, 1932.

Van KOOIJ, R. J., Van OOST, B. A. Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 2, p. 384-386, 1992.

VAN MUNSTER, E.B., STAP, J., HOEBE, R.A., TE MEERMAN, G.J., ATEN, A. T. Difference in volume of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm heads

matches difference in DNA content. **Cytometry**, v. 35, p. 125-128, 1999a.

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 a sorting X- and Y- bearing spermatozoa: a potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1281-1293, 1999b.

VICENTE, R., NADEAU, D. Adjustment of the osmolality of Percoll™ for the isopycnic separation of cells and cell organelles. **Analytical Biochemistry**, v. 141, n. 2, p. 322-328, 1984.

WAKIN, P.E. Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. **Osteopath Associativ**, v. 72, p. 173, 1972.

WANG, H. X., FLAHERTY, S. P., SWANN, N. J., MATTHEWS, C. D. Continuous Percoll™ gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. **Human Reproduction**, v. 9, n. 7, p. 1265-1270, 1994.

WATKINS, A. M., CHAN, P. J., PATTON, W. C., JACOBSON, J. D., KING, A. Sperm kinectics and morphology before and after fractionation on discontinuous: computerized analyses. **Archives of Andrology**, v. 37, n. 1, p. 1-5, 1996.

WEIGEL, K. A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. **Journal of Dairy Science**, v. 87 (Suppl.), p. 120-130, 2004.

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

WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 307–311, 1993.

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

WOLF, C.A., BRASS, K.E., RUBIN, M.I.B., POZZOBON, S.E., MOZZAQUATRO, F.D., DE LA CORTE, F.D. The effect of sperm selection by Percoll[®] or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 5, n. 3-4, p. 110-115, 2008.

CAPÍTULO 1

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO DE CÃES PARA UTILIZAÇÃO NA PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Artigo redigido segundo as normas da Molecular Reproduction and Development, ISSN 1098-2795, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2014

RESUMO

Apesar da semelhança aos outros tipos celulares, os espermatozoides possuem cromatina compacta o que dificulta a aplicação de protocolos de extração. Baseado nisto, esse estudo comparou diferentes concentrações espermáticas e três técnicas de extração de DNA para uso na PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Foram testados quatro protocolos, um não comercial que utiliza fenol:clorofórmio (M1) isolado ou associado a um kit preparatório (Differex System Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil – M2) e dois comerciais com mini-colunas de extração, denominados M3 (Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin, GE HealthCare, UK) e M4 (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega Biotecnologia do Brasil Ltda, Brasil). Foram utilizadas 4 concentrações espermáticas (1, 10, 30 e 50x10⁶ células) de ejaculados de 3 cães. Após a extração, o DNA foi utilizado para qPCR utilizando-se *primers* dirigidos contra os cromossomos X e Y. Os protocolos M1 e M2 recuperaram maior concentração de DNA em qualquer uma das concentrações espermáticas, com uma relação satisfatória das absorvâncias 260/280 (média 1,80 e 2,10, respectivamente). Contrariamente, os outros métodos recuperaram uma concentração de DNA baixa e de qualidade inferior no M3 (média 1,60 no M3 e 1,85 no M4), independente da concentração espermática. A extração de DNA das células espermáticas de cães utilizando os protocolos com fenol:clorofórmio (M1 e M2) foi eficiente e, especialmente o protocolo M1 permitiu a quantificação dos cromossomos X e Y na qPCR usando baixo número de células espermáticas (1x10⁶).

Palavras-chave: Cromossomo; Fenol-clorofórmio; Sêmen; Sexagem espermática.

ABSTRACT

Despite the similarity to other cell types, the sperm have compact chromatin, which hinders the application of DNA extraction protocols. Based on this, this study compared different sperm concentrations and three DNA extraction techniques to use in quantitative real-time PCR (qPCR). Four protocols were tested, a non-commercial protocol using phenol: chloroform (M1) alone or combined with a preparatory kit (Differex System Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil) and two commercial protocols with extraction mini-columns, M3 (Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, GE HealthCare, UK) and M4 (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil). Four sperm concentrations (1, 10, 30 e 50×10^6 de cells) of three dogs were used. After extraction, the DNA was used for qPCR using primers directed against the chromosomes X and Y. M1 and M2 protocol recovered increased concentration of DNA after extraction in any of sperm concentrations used, with a satisfactory ratio (1.80 to 2.10 respectively) for the absorbance 260/280. In other hand, the other methods recovered a decreased concentration of DNA of lower quality (ratio 260/280 of 1,60 for M3 and 1,85 for M4), regardless of the sperm concentration. The extraction of DNA from sperm cells of dogs using the protocol with chloroform:phenol (M1 and M2) was efficient and especially the M1 protocol permitted the quantification of X or Y chromosomes in qPCR with a low concentration of sperm cells (1×10^6).

Keywords: Chromossome; Clorophorm-phenol; Sexing sperm; Sperm.

INTRODUÇÃO

O crescente interesse na área de biologia molecular, tanto na medicina quanto na veterinária, permitiu a difusão, o aperfeiçoamento e a descoberta de técnicas aplicadas na investigação genética (BAREA et al., 2004; COELHO, 2004). Dentre estas, a PCR (reação em cadeia de polimerase) é uma das mais marcantes, desenvolvida por Mullis em 1983 (MULLIS; FALOONA, 1987) e apresenta inúmeras aplicações em vários ramos da pesquisa científica, especialmente no diagnóstico de doenças (SAIKI et al., 1988).

A PCR permite a replicação do DNA *in vitro* e a amplificação de

sequências específicas com alta sensibilidade e especificidade (BUENO, 2004). Por apresentar aplicações desde o diagnóstico clínico a programas de melhoramento genético (COELHO et al., 2004) tem sido alvo de muitos estudos. Todavia, para que a PCR seja empregada eficientemente, é necessária a extração de DNA em quantidade e qualidade apropriadas.

A extração de DNA é, portanto, a primeira etapa nas pesquisas no âmbito da biologia molecular, primordial para a identificação genotípica e técnica rotineira em laboratórios (BAREA et al., 2004; COELHO, 2004). O DNA pode ser oriundo de diversas amostras biológicas, mesmo em pequenas quantidades, tais como tecidos ou fluidos corporais, sangue, leite, sêmen, urina, saliva, pele, bulbo piloso, entre outros, sendo que, quando de fontes perecíveis, como o sêmen, necessita de correto armazenamento (MATIZONKAS et al., 2002).

Vários métodos de extração de DNA são descritos na literatura, no entanto, ainda existem problemas como contaminação por DNA estranho, inibidores enzimáticos da PCR e fragilidade do DNA (COELHO et al., 2004). Por esses motivos, um método de extração eficiente, livre de inibidores e que mantém a integridade do material genético é essencial para a correta aplicação na PCR e em outras técnicas moleculares. Para solucionar esses e outros problemas, os protocolos disponíveis atualmente têm sofrido alterações para adaptá-los conforme a necessidade (SOLLERO et al., 2004).

Um dos métodos convencionais é a associação de fenol e clorofórmio que tem sido usada com sucesso na extração de DNA, pois ambos provocam desnaturação de proteínas, fato que se fundamenta na propriedade hidrófoba destas macromoléculas e sua afinidade por solventes orgânicos (OLIVEIRA et al., 2007).

Outros protocolos convencionais, para obtenção de DNA, são baseados em kits comerciais nos casos de investigação criminal por abuso sexual, nos quais as células espermáticas estão misturadas a células epiteliais (TSUKADA et al., 2006), além de outros utilizados com células somáticas (LEE et al., 2003; NAMBA et al., 2003; QUEIPO-ORTUNO et al., 2008; EDWARDS et al., 2011; KAMANI et al., 2013; ABU-AMERO et al., 2013) que têm sido reportados com sucesso para extração em outros tipos celulares.

Por ser um processo longo e envolver excessiva manipulação, o

rendimento e a pureza do material nem sempre se mantém, podendo ocorrer contaminação e degradação do DNA (CROWER et al., 1991; FERNANDES et al., 2004), salientando a necessidade de melhorias e desenvolvimento de novos protocolos, principalmente no que concerne a métodos de extração de DNA a partir de amostras de sêmen.

A esse respeito, a maioria dos métodos rotineiramente empregados para o isolamento de DNA a partir de células somáticas tem sido ineficaz para o mesmo propósito em células espermáticas. É reconhecido que o DNA dos espermatozoides é seis vezes mais condensado do que o DNA de um cromossomo mitótico, o que o torna o DNA eucariótico existente mais fortemente condensado (POGANY et al., 1981). Nas células somáticas, o DNA é composto por histonas que nos espermatozoides são substituídas, gradualmente, durante a espermatogênese, por proteínas de transição e posteriormente por proteínas de baixa massa molecular, as protaminas, tornando o núcleo extremamente condensado (MARUSHIGE; MARUSHIGE, 1975). Devido a essa forte condensação da cromatina, o núcleo dos espermatozoides é menor do que o de células somáticas (EDDY, 2006) dificultando a extração do DNA dessas células pelos métodos existentes.

Usualmente, para extração do DNA de outras células como sangue são utilizadas amostras com volume de 200µL a 1mL, ou número total de células superior ou igual a 1×10^8 células (MANUAL GE, 2007). No entanto, o volume do ejaculado e concentração espermática de cães é baixa, sendo necessário o aprimoramento de uma técnica que permita a utilização de volumes menores para extração do DNA e posterior utilização na qPCR.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes métodos de extração de DNA espermático de cães para padronizar a técnica mais adequada para esse tipo de amostra e possibilitar sua utilização na qPCR, a fim de determinar a porcentagem de cromossomos X e Y em amostras sexadas. Além de padronizar a técnica de qPCR para análise dos cromossomos X e Y na espécie canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), Merck S.A. (São Paulo, Brasil) ou Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil), quando não, foram citados.

O trabalho foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Franca, sob protocolo nº 035/12 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº 146/2014.

Foram utilizados três cães, com idade média de 2 a 5 anos, sem raça definida, provenientes do canil de experimentação da FMVZ, UNESP, Botucatu. Todos foram examinados clínica e reprodutivamente antes do início do experimento.

Os animais foram selecionados de acordo com a facilidade na colheita e as características seminais, como recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), e condicionados à colheita de sêmen por manipulação digital do pênis (SEAGER; PLATZ, 1977), na ausência de uma fêmea.

Foram colhidos 4 ejaculados de cada cão em tubos plásticos de 15mL, acoplados a funis de silicone, previamente aquecidos. Apenas a segunda e parte da terceira fração foram colhidas.

O sêmen foi avaliado quanto às características macro e microscópicas: volume, cor, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

Após as análises da viabilidade espermática, as células foram divididas em 4 alíquotas, cada uma destinada a um tratamento. Então cada alíquota foi separada de acordo com a concentração espermática em 1, 10, 30 e 50x10⁶ de células.

Para a padronização da técnica, foram testados três protocolos, incluindo o descrito por Taylor (TAYLOR, 2005) com modificações, isoladamente (M1) ou associado a um método preparatório para separação das células somáticas (Differex System Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil), denominado M2, e dois protocolos comerciais que utilizam mini-colunas de

extração, denominados M3 (Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, GE HealthCare, UK) e M4 (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda, Brasil).

Anterior a extração, as células foram lavadas duas vezes completando o volume para 1mL com PBS pH 7,2, a 2.000xg, durante 10 minutos para retirada do plasma seminal. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi acrescido de tampão de lise (10 mM TRIS, 10 mM EDTA, 10mM NaCl, 2% mercaptoetanol, 0,5% de SDS, pH 8,0 ajustado com NaOH a 1M) para o M1. Nos protocolos M2, M3 e M4 foram utilizados os tampões fornecidos pelos kits. A seguir, as amostras foram congeladas a -80°C *overnight* e quando descongeladas foram sonicadas em banho de gelo utilizando uma probe de 3,0mm, numa amplitude de 20%, durante 30 segundos, repetidas por 10 vezes, com intervalos de 1 minuto entre as séries. A partir disso, M3 e M4 seguiram as instruções do fabricante. Para o protocolo M1 e M2, as amostras foram aquecidas a 50°C em banho-maria, durante 50 minutos. A seguir, foram adicionados 5µL de proteinase K a 20mg/mL; as amostras foram homogeneizadas gentilmente e incubadas durante 14 a 18 horas, a 50°C em banho-maria. Após a incubação, foram adicionados 250µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamil (25:24:1).

As amostras foram homogeneizadas por inversão do tubo e centrifugadas a 15.000xg, durante 10 minutos. A fase de menor densidade (porção superior do tubo) contendo o DNA foi retirada e transferida para um novo tubo. O processo foi novamente executado. As amostras recolhidas em novo tubo foram acrescidas de 1,0mL de etanol absoluto gelado e agitadas suavemente. Os tubos foram centrifugados a 15.000xg, durante 1 minuto, o etanol foi retirado (sobrenadante) e os tubos permaneceram abertos até a secagem. O DNA foi ressuspenso em 25µL de tampão de eluição (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7,4) e armazenado à -20°C.

Foi realizada análise da densidade óptica em espectrofotômetro para avaliar a concentração de DNA e a pureza das amostras obtidas após os procedimentos de extração. Todo material utilizado foi livre de nuclease e para iniciar o programa de leitura (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA), 1µL de água livre de nuclease foi inserida sobre o leitor. Então, as amostras foram analisadas, depositando-se a mesma quantidade sobre o leitor

(1 μ L) e avaliando os dados obtidos de concentração do DNA e a relação das absorvâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 como parâmetro da qualidade do DNA extraído.

Posteriormente, o DNA extraído foi submetido à qPCR utilizando-se os *primers* dirigidos contra o cromossomo Y (AF_107021.1) ou cromossomo X (NM_001003323.2). O kit GoTaq® qPCR Mastermix, (Promega, Madison, WI, USA) e o equipamento ABI 7500 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados para qPCR. A curva padrão da qPCR foi confeccionada com pool das amostras, diluídas em água nas diluições de 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 e 1:1.000.000. A concentração de DNA de cada amostra foi calculada com base na curva padrão pelo programa 7500 software 2.0.6 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil).

Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão e analisados por ANOVA e as comparações múltiplas pelo teste de Student-Newman-Keuls para os resultados da concentração de DNA, nos diferentes protocolos e concentrações espermáticas, utilizando-se o software SigmaPlot for Windows, v. 11.0, 2008, Systat Software Inc. Os resultados referentes à relação da absorvância 260/280 foram apresentados por estatística descritiva.

RESULTADOS

Os protocolos M1 e M2 recuperaram maior concentração de DNA ($p < 0,001$) após a extração em qualquer uma das concentrações espermáticas utilizadas, com uma relação entre as absorvâncias 260/280 satisfatória ($1,80 \pm 0,037$, variação entre 1,78 a 1,83; e $2,10 \pm 0,02$, variação entre 2,05 a 2,10, respectivamente). Contrariamente, os métodos M3 e M4 recuperaram uma concentração de DNA baixa ($p < 0,001$) e de qualidade inferior no M3 (relação 260/280: $1,60 \pm 0,10$, variação entre 1,26 a 1,93; e $1,85 \pm 0,18$, variação entre 1,36 a 2,59, respectivamente), independente da concentração espermática.

A quantidade de DNA extraída das amostras foi maior apenas na concentração espermática de 50×10^6 , quando comparada a 1×10^6 ($p = 0,042$). As outras concentrações não diferiram.

Quando as amostras foram submetidas à qPCR a amplificação foi observada nas amostras M1, permitindo a quantificação das células contendo o cromossomo X e Y, com correlação do log da concentração (R^2) de 0,995,

slope de -3,337 e eficiência de 99,387%. Os Cts (*threshold cycle* – limiar do ciclo) nestas amostras variaram entre 20 e 30 (Figura 1). Nos outros protocolos em raras amostras a amplificação foi verificada, mas com altos Cts (acima de 32), o que não foi considerado para a análise dos dados.

Tabela 1: Valores médios das concentrações de DNA (ng/μL) de espermatozoides de cães extraídas por 4 protocolos diferentes.

Concentração espermática	Protocolo – Concentração de DNA (ng/μL)			
	M1	M2	M3	M4
1 x 10 ⁶	896,5 ± 368,2	3.085,0 ± 809,7	4,0 ± 0,8	2,2 ± 0,5
10 x 10 ⁶	1.364,2 ± 718,8	4.191,6 ± 406,2	3,2 ± 0,1	2,8 ± 1,1
30 x 10 ⁶	2.614,8 ± 235,8	3.790,7 ± 802,0	3,3 ± 0,4	2,9 ± 1,1
50 x 10 ⁶	2.842,4 ± 208,1	4.194,5 ± 976,0	5,0 ± 0,7	3,1 ± 1,5
Média geral	1.929,5 ± 308,7a	3.815,4 ± 358,4b	3,9 ± 0,3c	2,8 ± 0,5c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

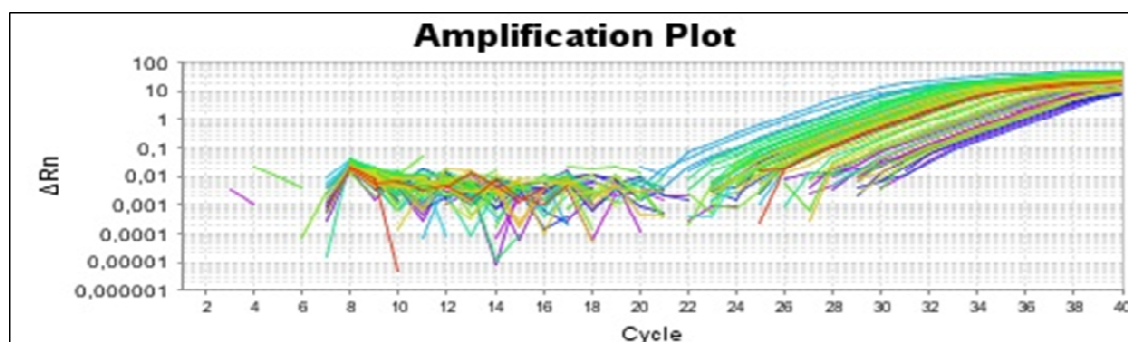


Figura 1: Gráfico de amplificação da qPCR das amostras de DNA espermático, extraídas pelo método do clorofórmio:fenol (M1).

DISCUSSÃO

O DNA em sua forma original dupla fita, é estável, resistente e se mantém inalterado em várias condições do meio e, em vista disto, a extração de DNA de uma grande variedade de células já foi elucidada. No entanto, apesar de semelhantes, os métodos desenvolvidos para o isolamento do DNA de células somáticas têm demonstrado insucesso quando tais técnicas são aplicadas as células espermáticas de mamíferos, tornando essencial que mais estudos sejam realizados para aprimorar e/ou elaborar outros métodos que possam permitir a obtenção de amostras contendo ácido nucléico de qualidade

(ALMEIDA et al., 2009).

Diversos protocolos associados ou não a kits comerciais podem ser utilizados para a extração de DNA de várias amostras biológicas, tal como foi testado nesse estudo para células espermáticas. Apesar da obtenção de amostras de DNA utilizando estes kits, a quantidade e qualidade foram inferiores, quando se comparou com a extração com clorofórmio:fenol. Este método já foi reportado, com sucesso, em outras espécies, para extração de DNA espermático (HANSON; BALLANTYNE, 2004; MARIA, 2012; SILVA et al., 2014), em vista da desnaturação de proteínas causada por esta solução. Isso significa que as proteínas desnaturadas por esse tratamento formam uma camada na interface separando duas fases distintas, e o DNA é mais facilmente extraído por se manter na fase aquosa (OLIVEIRA et al., 2007). De fato, este foi o método com resultados mais satisfatórios em termos de extrair uma amostra com qualidade apropriada e em quantidade suficiente para a qPCR.

Quando a amplificação ocorreu nas amostras de DNA extraídas com os kits comerciais, foi observado alto Ct, que é o número de ciclos necessários para a amplificação das amostras (WITTEWER et al., 1997), ou seja, é a intersecção entre a curva de amplificação e a linha limiar (*threshold line*), o qual permite calcular a quantidade relativa da concentração da sequência do gene alvo baseado numa curva padrão (VAERMAN et al., 2004). O alto Ct significa que há a necessidade de muitas repetições dos ciclos para se obter cópias desta sequência, necessárias para interpretação dos resultados, fazendo com que o modelo não tenha uma distribuição normal e reduzindo a repetibilidade dos resultados (BUSTIN, 2000). Assim, a sensibilidade da PCR em tempo real esta relacionada à capacidade da reação em indicar o valor absoluto do Ct. Os altos Cts (acima de 32 ciclos), na qPCR das amostras extraídas pelos protocolos M3 e M4 podem ser explicados pela quantidade e qualidade das mesmas, a qual também podem prejudicar a eficiência da PCR. Contrariamente, nas amostras extraídas pelo método M1, as amplificações ocorreram em ciclos anteriores (até 30 ciclos). Também é possível inferir que a quantidade de DNA extraída por este método contribuiu para melhor eficiência da PCR, em vista do aumento do sinal de fluorescência quando um alto número de cópias foi amplificado (WITTEWER et al., 1997).

A eficiência da qPCR obtida nas amostras extraídas pelo clorofórmio:fenol (99,387%) estava nos limites recomendados, entre 90 e 110% (LIFE-TECHNOLOGIES, 2011), o que permitiu inferir que a qualidade das amostras contribuiu para estes resultados. A eficiência da PCR indica a fração de sequências dos genes alvo que são copiadas em um ciclo da PCR (LALAM, 2006; ALVAREZ et al., 2007).

Além da eficiência da PCR, o valor de R^2 calculado pelo *software* nestas mesmas amostras ($R^2=0,995$), baseado na curva padrão, também é um parâmetro crítico para avaliar a reação. Este valor diz respeito à eficiência em prever a quantidade da sequência do gene alvo. Quanto mais próximo de 1, com um limite aceitável acima de 0,99, significa que o valor do eixo Y (Ct) pode ser usado para prever o valor do eixo X (LIFE-TECHNOLOGIES, 2011).

Além destes parâmetros, a eficiência da reação também pode ser medida pelo *slope*, sendo que o valor de $-3.3 \pm 10\%$ indicaria uma eficiência de $100\% \pm 10\%$ (LISS, 2002; SVEC et al., 2015), o qual foi similar ao encontrado no nosso estudo. Os parâmetros que mensuram a eficiência estão diretamente relacionados à sensibilidade do teste, sendo que quanto maior a eficiência, maior a sensibilidade (LIFE-TECHNOLOGIES, 2011).

No protocolo M2, que também utilizou clorofórmio:fenol, mas associado ao kit comercial, desenvolvido para separar as células espermáticas das somáticas em casos de abuso sexual em humanos, apesar da qualidade superior das amostras extraídas, quando comparado aos protocolos M3 e M4, a amplificação também ocorreu em raras amostras e com altos Ct. Acreditamos que possa ter ocorrido algum tipo de interação entre os reagentes do kit comercial e do método do clorofórmio:fenol, que prejudicou a amplificação. Ademais, não indicaríamos a utilização deste método, já que a quantidade de células somáticas observadas ao microscópio é muito baixa (dados não apresentados), menos que uma/10 campos, o que elevaria os custos das análises.

A PCR facilita a análise genética e permite a aplicação de técnicas de diagnóstico muito sensíveis e específicas porque é capaz de multiplicar uma região do genoma em milhões de cópias, por meio da amplificação de determinado segmento do DNA (OLIVEIRA et al., 2007). Para que essa reação seja possível, é necessário padronizar adequadamente os protocolos usados

em todas as fases dos procedimentos e que os componentes essenciais estejam presentes e reajam adequadamente. São componentes da PCR a amostra biológica cujo segmento de DNA será amplificado, uma mistura de nucleotídeos e enzima DNA-polimerase responsáveis pela síntese de novas fitas de DNA e consequente multiplicação, um co-fator da reação, além dos *primers* que são os iniciadores da amplificação por delimitarem e complementarem à região-alvo (OLIVEIRA et al., 2007). Na ausência de algum desses elementos, manipulação e/ou armazenamento incorreto, a reação de PCR pode ocorrer de forma indevida ou mesmo não ocorrer, como foi o caso do protocolo M2.

Apesar de possível, devido ao número de repetições e cuidados com o acondicionamento e a manipulação, submetendo as amostras à combinação adequada de temperatura e de tempo, não acreditamos em erro na execução dos procedimentos. Supomos que substâncias presentes no kit comercial utilizado nesse protocolo reagiram negativamente com aquelas presentes nos kits utilizados para amplificação, impedindo a mesma, já que utilizando o mesmo método de clorofórmio-fenol sem o emprego do kit comercial (M1) resultou na amplificação dos segmentos de DNA sem dificuldade.

Nos protocolos M3 e M4 foram utilizados kits comerciais que possibilitam o isolamento do DNA por meio da ligação deste à membrana da mini-coluna de extração, com posterior lavagem para purificação e eluição da amostra com um tampão. O uso de kits tem possibilitado a extração homogênea e rápida do DNA de diversos tipos celulares (QUEIPO-ORTUNO et al., 2008; EDWARDS et al., 2011; KAMANI et al., 2013; ABU-AMERO et al., 2013), no entanto, neste estudo, não demonstrou eficácia em extrair o DNA de espermatozoides. O núcleo dessas células é extremamente condensado e resistente a sonicação (LEE et al., 1995; KURETAKE et al., 1996; EDDY, 2006), e por isso impossibilitou a extração pelos métodos que já são empregados para outras células que não apresentam esse arranjo celular tão estável e resistente. Acreditamos que o método do clorofórmio-fenol tenha maior capacidade de destruir essa estrutura, expondo o núcleo e possibilitando a extração do DNA.

Na inexistência de um kit específico para extração de DNA espermático, o protocolo baseado em fenol:clorofórmio, apesar de demandar um maior tempo para sua execução, ser tóxico e poder contaminar a amostra, deve ser

considerado por ter custo acessível e principalmente por ser o método mais eficiente para este fim.

CONCLUSÃO

Com base em nosso conhecimento, este estudo fornece a primeira comparação de técnicas de extração de DNA de espermatozoides caninos. Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que independente da concentração espermática utilizada, a extração de DNA das células espermáticas do cão, utilizando fenol:clorofórmio tem resultados satisfatórios em relação a quantidade e qualidade da amostra extraída e permitiu a quantificação de sequências de genes alvo na qPCR, possibilitando o uso posterior na sexagem espermática e em outras biotecnologias.

REFERÊNCIAS

Abu-Amero KK, Jaeger M, Plantinga T, Netea MG, Hassan HY. 2013. Genetic variation of TLR2 and TLR4 among the Saudi Arabian population: insight into the evolutionary dynamics of the Arabian Peninsula. *Genet Test Mol Biomarkers* 17(2): 166-169.

Alvarez MJ, Vila-Ortiz GJ, Salibe MC, Podhajcer OL, Pitossi FJ. 2007. Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols. *BMC Bioinformatics* 8(85): 1-10.

Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. 2004. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter* 26(4): 274-28.

Barrach FH, Barea JA, Sales MM. 2000. O laboratório de análises clínicas e a identificação de predisposição genética para trombose venosa. *NewsLab* 38: 96.

Bueno V. 2004. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. *Rev Bras Hematol Hemoter* 26(4): 233-234.

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.

CBRA. 2013. Manual prático para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ªed., Belo Horizonte: Editora do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. p 1-87.

Coelho EGA, Oliveira DAA, Teixeira CS, Sampaio IBM, Rodrigues SG, Alves C. 2004. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arq Bras Med Vet Zootec* 56(1): 111-115.

Crowe JS, Cooper HJ, Smith MA, Sims MJ, Parker D, Gewert D. 1991. Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) product safter proteinase K digestion. *Nucleic Acids Res* 19(1): 184-186.

Eddy EM. 2006. The spermatozoon In EIL, J.D. Ed(s) Knobil and Neill' *Physiology of Reproduction*. United States of America: Elsevier.3-54.

Edwards KT, Goddard J, Jones TL, Paddock CD, Varela-Stokes AS. 2011. Cattle and the natural history of rickettsia parkeri in Mississippi. *Vec Borne Zoo Dis* 11(5): 485-491.

Fernandes JV, Meissner RV, Fernandes TAAM, Rocha LRM, Cabral MC, Villa LL. 2004. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J Bras Patol Med Lab* 40(3): 141-146.

Hanson EK, Ballantyne J. 2004. A highly discriminating 21 locus Y-STR "megaplex" system designed to augment the minimal haplotype loci for forensic casework. *J Forensic Sci* 49: 40-51.

Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu KY, Waziri NE, Eyal O, Guthmann Y, Harrus S. 2013. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLOS Neg I Trop Dis* 7(3): 1-7.

Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol reprod* 55: 789-95.

Lalam N. 2006. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J Theor Biol* 242(4):947–953.

Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. 1995. Premature translation of protamine 1mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *PNAS* 92: 12451-55.

Lee YK, Kim HW, Liu CL, Lee HKA. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacterium that produce extracellular materials. *J Micro Methods* 52: 245-250.

Life Technologies - Real-time PCR: understanding Ct application note, Life Technologies Corporation, p. 1-6, 2011.

Liss B. 2002. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 30 (17): 1-9.

Maria FA. 2012. Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozoides de camundongos. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 55-56.

Marushige Y, Marushige K. 1975. Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *J Biol Chem* 250: 39-45.

Matizonkas LF, Mesquita RA, Tucci R, Nunes FD. 2002. Extração rápida de DNA para uso no diagnóstico histopatológico e estudos retrospectivos: comparação de quatro métodos. *Rev Pós Grad Fac Odont USP* 9(2): 137-41.

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a

polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50.

Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. 2003. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4393–4397.

Oliveira MCS, Regitano LCA, Roese AD, Anthonisen DG, Patrocínio E, Parma MM, Scagliusi SMM, Timóteo WHB, Jardim SN. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. ISBN: 978-85-86764, 12-17.

Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R. 1981. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 136(1): 127-136.

Queipo-Ortuno MI, Tena E, Colmenero JD, Morata P. 2008. Comparasion of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 109-114.

Saiki RK, Gilfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Seager SWJ, Platz, CC. 1977. Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Vet Clin North Am* 7: 757-64.

Silva ECB, Pelinca MA, Acosta AC, Silva DMF, Gomes Filho MA, Guerra MMP. 2014. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis. *Genet Mol Research* 13(3): 6070-78.

Sollero BP, Faria DA, Paiva SR, Guimarães SEF, Lopes OS, Paixão DM. 2004. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: 14^o Congresso Nacional de Zootecnia. Brasília: Anais do 14^o Congresso Nacional de Zootecnia.

Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments? *Biomol Detect Quantif*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

Taylor TM. 2005. Comparing calf sex ratio and semen sex ratio determined by conventional PCR. Dissertation of Master, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Program in Animal and Dairy Sciences, Southern Arkansas University, 10-11.

Tsukada K, Asamura H, Ota M, Kobayashi K, Fukushima H. 2006. Sperm DNA extraction from mixed stains using Differex System. Elsevier, International Congress Series 1288: 700-703.

Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents* 18: 212-214.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1):130-138.

CAPÍTULO 2

1 **COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE CENTRIFUGAÇÃO EM**
2 **GRADIENTE DE DENSIDADE PARA SEXAGEM ESPERMÁTICA EM CÃES**

3
4 Artigo redigido segundo as normas da *Reproduction in Domestic Animals*, ISSN 0936-
5 6768, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2014

6
7
8 **Resumo**

9 A sexagem espermática de bovinos já é bem difundida mundialmente utilizando
10 diferentes técnicas. Em cães, apesar de estudos escassos, é de interesse para os
11 criadores, por se tratar de espécie múltipara, na qual o maior número de descendentes
12 do mesmo sexo favorece o mercado. Baseado nisso, este estudo avaliou os efeitos sobre
13 a qualidade espermática e a eficácia de três gradientes descontínuos de densidade na
14 separação das células espermáticas de cães, contendo os cromossomos X e Y. Foram
15 utilizadas 30 amostras de sêmen, de 10 cães adultos, colhidas por manipulação digital
16 do pênis. Após a colheita e após a centrifugação nos gradientes, as células foram
17 avaliadas quanto aos índices de motilidade computadorizada, concentração e
18 concentração espermática recuperada (pós-centrifugação), morfologia espermática e
19 integridade das membranas plasmática e acrossomal, e função mitocondrial. As células
20 foram separadas utilizando-se três gradientes descontínuos de centrifugação, Percoll[®],
21 Percoll[®] associado ao Nycodenz[®] e Ficoll. A porcentagem de células espermáticas
22 contendo os cromossomos X e Y foi avaliada anterior e após a centrifugação por PCR
23 quantitativa em tempo real. O Ficoll manteve maior qualidade espermática após a
24 centrifugação, no entanto, o enriquecimento de espermatozoides contendo cromossomos
25 X ou Y não foi observado em nenhum dos métodos (Percoll[®] 54,8±1,9 vs 45,2±1,9;
26 Percoll[®] associado ao Nycodenz[®] 53,2±2,0 vs 46,8±2,0; Ficoll 55,0±1,5 vs 45,0±1,5,
27 respectivamente para as porcentagens de células contendo o cromossomo X e Y). Em
28 vista dos resultados, conclui-se que a sexagem das células espermáticas de cães
29 utilizando-se os gradientes de densidade não é uma técnica capaz de separar as
30 populações visando a aplicação comercial.

31
32 Palavras-chave: Cão; Cromossomo; Espermatozoide; Ficoll; Percoll[®]; Nycodenz[®].

33
34

35 **Contents**

36 Sperm sexing bovine is widely spread through different techniques. In dogs, although
37 few studies, it is interesting because to be multiparous, the largest number of
38 descendants of the same sex is facilitated and favors the market. Based on this, the study
39 evaluated the efficacy of three discontinuos density gradients in separating the sperm
40 cells of dogs containing the X and Y chromosomes and verified the effects of separation
41 on the quality of sperm. 30 canine semen samples (10 dogs) were used, collected by
42 digital manipulation of the penis. After collection and centrifugation, sperm cells were
43 evaluated for motility by CASA system (Computer-Aided Semen Analyzer),
44 concentration and recovered concentration after centrifugation, sperm morphology and
45 integrity of the plasma membrane, acrosomal and mitochondrial function. Cells were
46 separated using three discontinuous gradient centrifugation, Percoll[®], Percoll[®]
47 associated to Nycodenz[®] e Ficoll. The percentage of sperm cells containing the X and Y
48 chromosomes were evaluated before and after centrifugation by quantitative real-time
49 PCR. The Ficoll maintained higher sperm quality after centrifugation, however, the
50 sperm enrichment containing X or Y chromosomes was not observed in any of the
51 methods (Percoll[®] 54,8±1,9vs45,2±1,9; Percoll[®] associated to Nycodenz[®]
52 53,2±2,0vs46,8±2,0; Ficoll 55,0±1,5vs45,0±1,5, respectively, for the percentages of
53 cells containing the X and Y chromosome). By the results, it is concluded that sexing
54 sperm of canine cell using the density gradient is not an effective technique for
55 commercial application.

56

57

58 Keywords: Chromossom; Dog; Ficoll; Percoll[®]; Nycodenz[®]; Spermatozoon.

59

60 **Introdução**

61 O mercado *pet* tem se destacado como segmento da economia por ser rentável e atrair a
62 atenção de criadores, proprietários e, conseqüentemente, pesquisadores interessados em
63 aprimorar e incorporar técnicas que permitam a sua progressão (Marquezi 2007).

64 A sexagem espermática é uma dessas técnicas que visam à melhoria dos índices de
65 produtividade e aceleração do melhoramento genético e tem se destacado
66 principalmente na criação de bovinos (O'Brien et al. 2009). Entretanto, em cães ainda
67 não é uma realidade, uma vez que há raros estudos nessa espécie, embora o
68 desenvolvimento de uma progênie de sexo pré-determinado, em animais múltiparos

69 como os caninos, possa favorecer o comércio, resultando em aumento da lucratividade e
70 ascensão desse segmento econômico.

71 Além do ponto de vista zootécnico, o desenvolvimento da sexagem espermática
72 também tem importância na conservação de animais ameaçados de extinção, utilizando
73 animais domésticos como modelo experimental (Pukazhenth et al. 2006).

74 Várias técnicas em diferentes espécies já foram descritas para a separação dos
75 espermatozoides contendo os cromossomos X e Y, mas somente as que se baseiam na
76 diferença do conteúdo de DNA, entre esses dois tipos celulares, foram comprovadas *in*
77 *vitro* e *in vivo* (Johnson 1995; Jafar e Flint 1996; Johnson 2000; Garner 2006). Dentre
78 estas técnicas destacam-se a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente
79 descontínuo de densidade (Lima 2006; Seidel 2007).

80 Apesar de apresentar acuidade acima de 90% e alta repetibilidade em bovinos e ser uma
81 técnica cada vez mais utilizada para este fim (Welch e Johnson 1999; Johnson et al.
82 1999; Mocé et al. 2006; Freitas 2007), para execução da citometria de fluxo são
83 necessários equipamentos sofisticados, o que onera a produção. Além disso, esta técnica
84 danifica as células espermáticas, reduzindo sua capacidade de fertilização (Seidel 2003;
85 Telford et al. 2003; Cran 2007; Garner 2009).

86 Contrariamente, a centrifugação em gradiente de densidade pode ser uma alternativa,
87 considerando a simplicidade da técnica e equipamentos empregados. Diferentes meios
88 são utilizados para compor os gradientes, como Ficoll-metrizoato de sódio, Percoll[®]
89 isoladamente ou associado a outros gradientes, como OptiPrep, IxaPrep e Nycoprep[®]
90 (Shastry et al. 1977; Andersen e Byscov 1997; Classens et al. 1998; Mc Cann e Chantler
91 2000; Resende et al. 2009). Para confirmar a separação espermática, técnicas como
92 citometria de fluxo, coloração com quinacrina, PCR e FISH já foram descritas (Ogawa
93 et al. 1988; Johnson 1994; Welch e Johnson 1999; Joerg et al. 2004; Parati et al. 2006).

94 Recentemente, a sexagem espermática em cães foi realizada pela citometria de fluxo
95 com enriquecimento de 88 a 93% de X e 86 a 93% de Y (Oi et al. 2013) e pela
96 centrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®] que também promoveu o
97 enriquecimento do cromossomo X em comparação aos valores iniciais (Silva 2013), no
98 entanto, a recuperação espermática foi insuficiente na citometria e o enriquecimento de
99 X foi abaixo do esperado na centrifugação (Oi et al. 2013; Silva 2013), não permitindo a
100 aplicação comercial de ambas.

101 Nesse sentido, salienta-se a necessidade de estudos para desenvolver uma técnica
102 prática e eficiente que promova o enriquecimento de espermatozoides contendo os

103 cromossomos X e Y e mantenha a sua quantidade e qualidade (Seidel 2007).
104 Baseado nisso, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia da separação das células
105 espermáticas de cães contendo os cromossomos X ou Y utilizando-se 3 gradientes de
106 densidade, Percoll[®], Percoll[®] associado ao Nycodenz[®] e Ficoll, e os efeitos promovidos
107 pela centrifugação sobre a quantidade e qualidade dos espermatozoides.

108

109 **Material e métodos**

110

111 **Aspectos éticos**

112 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
113 (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pelo
114 Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Franca, sob protocolo
115 nº 035/12 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de
116 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº
117 146/2014.

118

119 **Materiais**

120 Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e adquiridos das empresas
121 GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), Merck S.A. (São
122 Paulo, Brasil) ou Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil), quando não,
123 foram citados.

124

125 **Animais**

126 Foram utilizados 10 machos clinicamente saudáveis, com idade média de 2 a 6 anos, de
127 diferentes raças (1 Boxer, 4 Pointer Inglês, 1 Labrador e 4 sem raça definida), sendo 7
128 provenientes do canil de experimentação da FMVZ, UNESP, Botucatu e 3 cedidos por
129 proprietários. Os animais foram alojados em canis individuais, de tamanho 2,3x3,5m,
130 alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Para a seleção dos cães foram
131 consideradas as características seminais, de acordo com o Colégio Brasileiro de
132 Reprodução Animal (CBRA 2013) e o temperamento adequado ao manejo.

133

134 **Colheita do sêmen**

135 A colheita do sêmen foi realizada por manipulação digital do pênis (Seager e Platz
136 1977), na ausência ou presença de uma fêmea em cio para estimulação.

137 Foram colhidos 3 ejaculados de cada cão (n=30) em tubos plásticos de 15 mL,
138 acoplados a funis de silicone, previamente aquecidos. Apenas a segunda e parte da
139 terceira fração foram colhidas.

140

141 **Avaliação do sêmen fresco**

142 O sêmen foi avaliado pré e pós-centrifugação nos gradientes descontínuos de densidade
143 quanto aos parâmetros de motilidade espermáticos, integridade das membranas
144 plasmática e acrossomal, atividade citoquímica mitocondrial, peroxidação lipídica,
145 concentração pré e pós-centrifugação e morfologia espermática.

146 O volume foi avaliado pré-centrifugação e determinado por observação direta do tubo e
147 expresso em mL.

148 A motilidade espermática foi analisada pelo método CASA (Hamilton-Thorne
149 Computer-Aided Semen Analyzer (CASA), versão 10 Ivos, HTR-IVOS 10 Analyzer,
150 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA, Quadro 1), de acordo com Iguer-
151 Ouada e Verstegen (2001). Uma alíquota de ~5 µL foi depositada sobre uma câmara de
152 Makler e as células foram avaliadas em 5 campos aleatórios/amostra. Foram avaliados
153 os seguintes parâmetros de motilidade: motilidade total (MT, %), motilidade
154 progressiva (MP, %), velocidade média (VAP - um/s), velocidade linear (VSL - um/s),
155 velocidade curvilinear (VCL, um/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça
156 (ALH, mm), a frequência de deslocamento da cabeça = frequência de batimento flagelar
157 (BCF, Hz), a média de coeficiente (STR, %), que indica a linearidade da trajetória
158 média e é definido como $(VSL/VAP) \times 100$, coeficiente linear (LIN, %), que é a relação
159 entre o deslocamento linear da soma dos deslocamentos durante o tempo de medição e
160 que é definida como $(VSL/VCL) \times 100$. Além disso, de acordo com a VAP de baixo
161 corte (LVV) e VAP de médio corte (MVV), a população total de espermatozoides foi
162 dividida em quatro categorias: rápidos, com $VAP > MVV$; médio, com $LVV < VAP$
163 $< MVV$; lento, com $VAP < LVV$ e estática, que é a proporção de células sem
164 movimento. Utilizando-se os valores de VAP e VCL foi calculado o coeficiente de
165 oscilação (WOB, %), pela fórmula $(VAP/VCL) \times 100$.

166 Os parâmetros encontrados no CASA foram utilizados para o cálculo do índice de
167 velocidade e índice de movimento espermático, de acordo com Agarwal et al. (2003),
168 modificado por Núñez-Martinez et al. (2006): Índice de velocidade espermática (IND
169 VEL) = $(VCL \times 0,87) + (VSL \times 0,76) + (VAP \times 0,90) + (ALH \times 0,92)$; e Índice de
170 movimento espermático (IND MOV) = $(VSL \times 0,59) + (VAP \times 0,37) + (LIN \times 0,95) +$

171 $(STR \times 0,89) + (WOB \times 0,83)$.

172 A câmara hematimétrica de “Neubauer” foi utilizada para determinar a concentração
 173 espermática da amostra de sêmen diluída em formol-salina tamponada na proporção de
 174 1:20. Uma alíquota diluída foi depositada na câmara e analisada sob microscópio de
 175 contraste de fase, num aumento de 400x e as células espermáticas foram contadas e
 176 expressas em milhões/mL. A quantidade total de células no ejaculado foi calculada,
 177 multiplicando-se o volume do ejaculado pela concentração de espermatozoides/mL.

178

179 Quadro 1. Configuração do sistema CASA usado para analisar as células espermáticas
 180 caninas.

181	Parâmetro	Unidade
182	Taxa de imagens/seg	60
183	Número de imagens	50
184	Contraste mínimo	40
185	Mínimo de células	6
186	Tamanho celular	5
187	Intensidade celular	45
188	Cutoff médio VAP	60
189	Cutoff baixo VAP	30
190	STR	70
191	Cutoff VSL	20
192	Temperatura (°C)	38
193	Câmara usada	Makler*

195

196 *Makler Counting Chamber, Lexington, KY, USA

197

198 A morfologia espermática foi avaliada por coloração dos esfregaços pelo método de
 199 Karras modificado (Papa et al. 1988) e as células foram contatadas até um total de 200,
 200 avaliando-se a porcentagem de células morfologicamente normais, ou com defeitos
 201 maiores ou menores (Blom1972).

202 Para a avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizado o
 203 iodeto de propídio, FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato
 204 de fluoresceína) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003)

205 modificado por Freitas-Dell'Aqua (2011), com a adição do Hoechst 33342 em solução
206 aquosa, numa concentração de 100µg/mL. Uma amostra de 400µL de sêmen diluído em
207 TALP, segundo Parrish et al. (1988) modificado (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM
208 NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM
209 MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool
210 polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 10x10⁶
211 espermatozoides/mL foi acrescida de 2µL da solução de Hoechst e incubada durante 5
212 min à 37°C. A seguir, 5µL de iodeto de propídio (50µg/mL em TALP) e 0,5µL de
213 FITC-PSA (1mg/mL em TALP) foram adicionados à amostra, homogeneizados e
214 incubados por mais 10 minutos, na mesma temperatura, ao abrigo da luz. Ao término
215 deste período, a amostra foi avaliada no citômetro de fluxo. Os espermatozoides foram
216 classificados em 4 grupos: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (MPLAI);
217 membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL); membrana plasmática e
218 acrossomal íntegras (MPAI); e, membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada
219 (MPIAL). Para os resultados, apenas os espermatozoides com MPAI foram
220 computados.

221 A atividade citoquímica mitocondrial foi avaliada de acordo com Freitas-Dell'Aqua
222 (2011) utilizando o corante JC-1. Uma alíquota de 500µL de sêmen (10x10⁶
223 espermatozoides/mL) foi acrescida de 4µL da solução de JC-1 (50µg/mL em DMSO), e
224 mantidas durante 40 min, a 25°C. Após este período, 100µL desta solução foi diluída
225 1:5 em meio TALP contendo 2µM de Hoechst 33342 em solução aquosa e,
226 imediatamente, avaliada por citometria de fluxo. Nesta técnica os espermatozoides
227 foram classificados em três grupos: alto (HMP), médio (MMP) e baixo (LMP) potencial
228 mitocondrial. Para as análises de citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BD
229 LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers azul
230 488nm, 100mW; vermelho 640nm, 40mW e violeta 405nm. Os dados foram avaliados
231 por um programa do mesmo fabricante BD FACS Diva™ software v 6.1.

232

233 **Preparação do sêmen sexado**

234 Foram testados 3 protocolos de separação das células espermáticas contendo o
235 cromossomo X ou Y. Cada ejaculado foi dividido em 4 alíquotas, sendo 3 utilizadas
236 para centrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Percoll[®],
237 Percoll[®]/Nycodenz[®] e Ficoll). A alíquota restante (controle) foi armazenada como
238 amostra de sêmen para extração de DNA e qPCR.

239 O gradiente de Percoll[®] foi baseado nos estudos de Andersen e Byskov (1997) e
240 modificado para 7 concentrações de Percoll[®] que variaram entre 30 a 90% (30, 40, 50,
241 60, 70, 80 e 90%). O Percoll[®] 90% foi preparado com 9 partes de Percoll Plus[®] (GE
242 HealthCare, cód. 17-5445-01, Uppsala, Suécia) e 1 parte de meio Earles10X (100mM
243 NaCl, 10mM KCl, 3,5mM CaCl, 1,5mM MgCL, 30mM C₂H₃NaO₂, 6mM Na₃C₆H₅O₇,
244 em solução aquosa). A partir desse, as outras concentrações foram preparadas diluindo-
245 se o Percoll[®] 90% em meio Earles 1X, formando as 7 concentrações, que foram
246 depositadas (700µL/camada), cuidadosamente, num tubo plástico de 15mL
247 sucessivamente da maior concentração para a menor.

248 O gradiente de Percoll[®]/Nycodenz[®] também se baseou no protocolo descrito por
249 Andersen e Byskov (1997) com modificações. Foram preparadas as 7 concentrações
250 descritas para o gradiente de Percoll[®], utilizando-se o mesmo meio. O Nycodenz[®]
251 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanha) foi acrescido de 2µM HEPES
252 na proporção de 1:10 (1 parte de Nycodenz[®] e 9 partes da solução de HEPES). A seguir o
253 Nycodenz[®] (700 µL) foi depositado na base do tubo, seguido pelas 7 camadas de
254 Percoll[®] (700 µL/camada) da maior para a menor concentração.

255 O gradiente de Ficoll foi preparado de acordo com Hegde et al. (1977) e Davis e
256 Halliday (1977) com modificações. O Ficoll (Histopaque[®], cód. 1077, Sigma-Aldrich,
257 São Paulo, SP, Brasil) já acrescido de metrizoato de sódio, foi utilizado sem diluição em
258 uma única camada, depositando-se 1,5mL no fundo de um tubo de 15 mL.

259 A osmolaridade dos gradientes variaram entre 280 e 320 e o pH foi ajustado para 6,8 a
260 7,2, quando necessário, com ácido acético glacial (Percoll[®]) ou hidróxido de sódio
261 (Nycodenz[®] e Ficoll). Todos os protocolos foram escolhidos mediante teste de
262 osmolaridade que se aproximaram dos valores ideais para manutenção da viabilidade
263 espermática do cão (280 a 300mOsmol).

264 Após a preparação de cada gradiente, as amostras de sêmen fresco contendo uma
265 concentração pré-determinada de 100x10⁶ de células, foram depositadas sobre os três
266 tubos e estes foram centrifugados simultaneamente à 100xg, durante 45 minutos, na
267 temperatura ambiente.

268

269 **Avaliação da qualidade da amostra após sexagem**

270 Após a centrifugação, o sedimento (fundo do tubo) de cada tubo foi recolhido e as
271 amostras reavaliadas para os mesmos parâmetros espermáticos e a taxa de recuperação
272 espermática (número de células/1,0mL).

273 Extração do DNA e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

274 Para mensurar o enriquecimento das células contendo os cromossomos X e Y de cada
275 tratamento e compará-lo com a amostra de sêmen fresco, foi utilizada a qPCR.

276 Para a extração foi utilizado protocolo baseado em clorofórmio-fenol, modificado. Uma
277 alíquota, contendo 1×10^6 espermatozoides foi depositada em tubo plástico de 1,5mL
278 livre de nucleases e foi acrescida de tampão de lise (10mM TRIS, 10mM EDTA, 10mM
279 NaCl, 2% mercaptoetanol, 0,5% de SDS, pH 8,0 ajustado com NaOH a 1M). A seguir,
280 as amostras foram congeladas a -80°C *overnight*. Após a descongelação, as amostras
281 foram sonicadas e então aquecidas a 50°C em banho-maria, durante 50 minutos.
282 Passado esse tempo, foi acrescido $5\mu\text{L}$ de proteinase K a 20mg/mL; as amostras foram
283 homogeneizadas gentilmente e incubadas *overnight* a 50°C . Após a incubação, foram
284 adicionados $250\mu\text{L}$ de fenol:clorofórmio:álcool-isoamil (25:24:1), as amostras foram
285 homogenizadas gentilmente e centrifugadas à $15.000 \times g$ por 10 minutos, transferindo-se
286 o sobrenadante para novo tubo e repetindo o processo por mais uma vez. As amostras
287 então foram acrescidas de 1,0mL de etanol absoluto gelado e agitadas suavemente. Os
288 tubos foram centrifugados a $15.000 \times g$ por 1 minuto, o etanol foi retirado (sobrenadante)
289 e os tubos permaneceram abertos até a secagem. Cada DNA foi ressuspendido em $25\mu\text{L}$
290 de tampão de eluição (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7,4) e armazenado à -20°C até a
291 execução da qPCR.

292 A qualidade e quantidade do DNA extraído foram avaliadas por
293 nanoespectrofotometria. Inicialmente, água livre de nucleases foi utilizada como tubo
294 branco. Em seguida, as amostras foram avaliadas individualmente depositando-se $1\mu\text{L}$
295 sob o leitor e conferindo a concentração do DNA. A qualidade do DNA extraído foi
296 avaliada pela relação entre a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280
297 (DO 260/280).

298 Após análise da extração, a partir de um pool das amostras diluído em água livre de
299 nucleases, nas proporções 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 e 1:1.000.000, foi
300 confeccionada a curva padrão da qPCR. Estas amostras foram submetidas à qPCR
301 utilizando-se os *primers* dirigidos contra o cromossomo Y ou cromossomo X (Quadro
302 2) e calculando a concentração de DNA com base na curva padrão pelo programa 7500
303 versão 2.0.6 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil). O kit GoTaq® qPCR
304 Mastermix, (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante e o
305 equipamento ABI 7500 (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados
306 para qPCR. Foi estipulado o mesmo *threshold* (0,1) para os dois genes e cada corrida,

307 foi utilizado um controle negativo contendo apenas água livre de nucleases no lugar da
 308 amostra. A porcentagem dos cromossomos X e Y foram calculadas segundo Parati et al.
 309 (2006), de acordo com as equações a seguir:

$$n = \frac{\%X}{\%Y} \qquad \%X + \%Y = 100\% \qquad \%X = \frac{n \times 100}{n + 1}$$

310

311 Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos dos genes utilizados para *qPCR*.

Nº acesso do gene*	Localização	Sequência de oligonucleotídeos (5'>3')	Tamanho do produto (bp) (start-stop)
AF_107021.1 (<i>Canis familiaris</i>) - Região determinadora do sexo (<i>SRY</i>)	Cromossomo Y	<i>Forward primer (5'3')</i> CTCGCGATCAAAGGCGCAAGAT	446 - 467
		<i>Reverse primer (3'5')</i> TTCGGCTTCTGTAAGCATTTTC	549 - 528
NM_001003323.2 (<i>Canis familiaris</i>) - fator de coagulação IX (<i>F9</i>)	Cromossomo X	<i>Forward primer (5'3')</i> CCCAAGAGGCCACTGGAAAT	68 - 87
		<i>Reverse primer (3'5')</i> TGTGCAAGGAGCAAGGTTGA	186 - 167

312 *GenBank, no www.ncbi.nlm.nih.gov

313

314 **Análise estatística**

315 Os resultados foram apresentados em média ± erro padrão e analisados por ANOVA,
 316 seguido de comparações múltiplas pelo método de Student-Newman-Keuls, utilizando-
 317 se o software Sigma Plot for Windows, v. 11.0, 2008, Systat Software Inc.

318

319 **Resultados**

320 Conforme a Tabela 1, todas as variáveis espermáticas avaliadas foram superiores no
 321 sêmen fresco, com exceção de alguns parâmetros de motilidade e atividade mitocondrial
 322 que não variaram. Os gradientes Percoll®/Nycodenz® e Ficoll foram superiores na
 323 maioria dos parâmetros avaliados quando comparados ao Percoll® isolado. Contudo, o
 324 Ficoll recuperou células espermáticas com maior motilidade total e progressiva, maior
 325 quantidade de espermatozoides rápidos e menor de estáticos e maior quantidade de
 326 membranas íntegras. Embora a quantidade de espermatozoides recuperados após a
 327 centrifugação tenha sido igual para todos os gradientes, nenhum dos métodos foi capaz
 328 de enriquecer as amostras com células contendo os cromossomos X e Y.

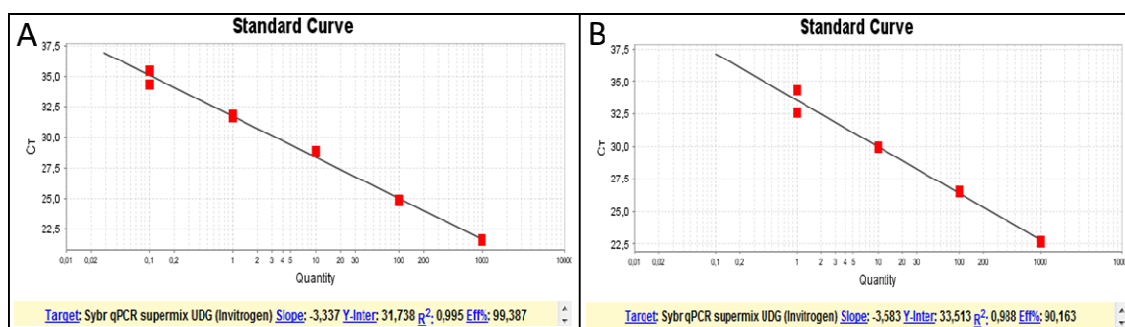
329

330 Tabela 1. Valores médios das variáveis espermáticas e da porcentagem de
 331 espermatozoides contendo os cromossomos X e Y, pré (fresco) e pós-centrifugação em
 332 três gradientes descontínuos de densidade (Percoll[®], Percoll[®]/Nycodenz e Ficoll).

VARIÁVEL	TRATAMENTO			
	Fresco	Percoll [®]	Percoll [®] / Nycodenz [®]	Ficoll
C SPTZ (x10 ⁶)	100,0 ^{a*}	42,5±3,1 ^{b**}	47,4±3,4 ^{**}	60,0±3,4 ^{b**}
MT (%)	86,1±1,1 ^a	13,9±3,1 ^b	41,6±5,2 ^c	62,2±4,1 ^d
MP (%)	64,4±2,2 ^a	6,7±2,3 ^b	27,8±4,4 ^c	36,4±3,5 ^d
VAP (µm/s)	120,9±4,1 ^a	67,3±4,1 ^b	78,7±3,3 ^c	78,0±2,6 ^c
VSL (µm/s)	101,9±4,1 ^a	55,7±3,5 ^b	67,5±3,5 ^c	65,2±2,4 ^c
VCL(µm/s)	182,6±5,0 ^a	113,5±7,8 ^b	128,3±4,5 ^b	119,1±3,4 ^b
ALH (mm)	6,9±0,2	5,5±0,7	6,3±0,3	5,7±0,2
BCF (Hz)	25,7±0,8 ^{ac}	21,9±1,4 ^b	26,1±0,9 ^c	23,5±0,7 ^{bc}
STR (%)	82,3±1,0	81,4±2,4	84,4±1,3	82,3±0,8
LIN (%)	56,2±2,0	55,9±2,9	55,4±2,5	56,0±1,4
WOB (%)	66,4±1,7	61,9±2,7	61,8±2,0	65,6±1,3
INDVEL	351,5±10,0 ^a	206,7±12,2 ^b	239,5±8,6 ^c	228,7±6,5 ^{bc}
INDMOV	286,7±7,4 ^a	234,7±7,9 ^b	247,8±7,7 ^b	248,4±4,8 ^b
RAP (%)	77,1±3,1 ^a	8,9±3,0 ^b	31,3±5,0 ^c	44,2±4,1 ^d
MED (%)	6,8±1,1 ^a	5,1±0,7 ^a	10,4±1,2 ^b	18,0±1,5 ^c
LENT (%)	12,1±0,9 ^a	50,4±4,0 ^b	33,2±3,2 ^c	30,8±3,1 ^c
ESTAT (%)	1,9±0,6 ^a	35,6±4,0 ^b	25,2±3,5 ^c	6,8±2,4 ^a
MPAI (%)	86,2±2,1 ^a	27,3±3,7 ^b	33,7±5,7 ^b	51,3±3,9 ^c
HMP (%)	64,1±4,5	54,2±4,2	61,9±3,3	57,5±4,4
MMP (%)	32,1±4,0	38,9±3,4	35,3±2,8	35,8±3,6
LMP (%)	3,8±1,0	6,9±3,5	2,7±1,0	6,7±1,8
PER (%)	20,9±3,1 ^a	37,8±3,1 ^b	34,5±3,1 ^b	32,2±3,7 ^b
MORF NORM (%)	68,7±3,2	67,5±2,7	76,5±2,8	69,5±3,1
DMA (%)	5,5±0,6	4,1±0,4	4,6±0,6	6,5±0,8
DME (%)	23,5±2,4	26,1±1,7	16,5±1,3	21,8±2,1
X (%)	49,8±2,3	54,8±1,9	53,2±2,0	55,0±1,5
Y (%)	50,3±2,3	45,2±1,9	46,8±2,0	45,0±1,5

333 Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$). *Concentração espermática
 334 retirada da amostra de sêmen fresco e depositada sobre o gradiente. **Concentração espermática
 335 recuperada em cada gradiente.

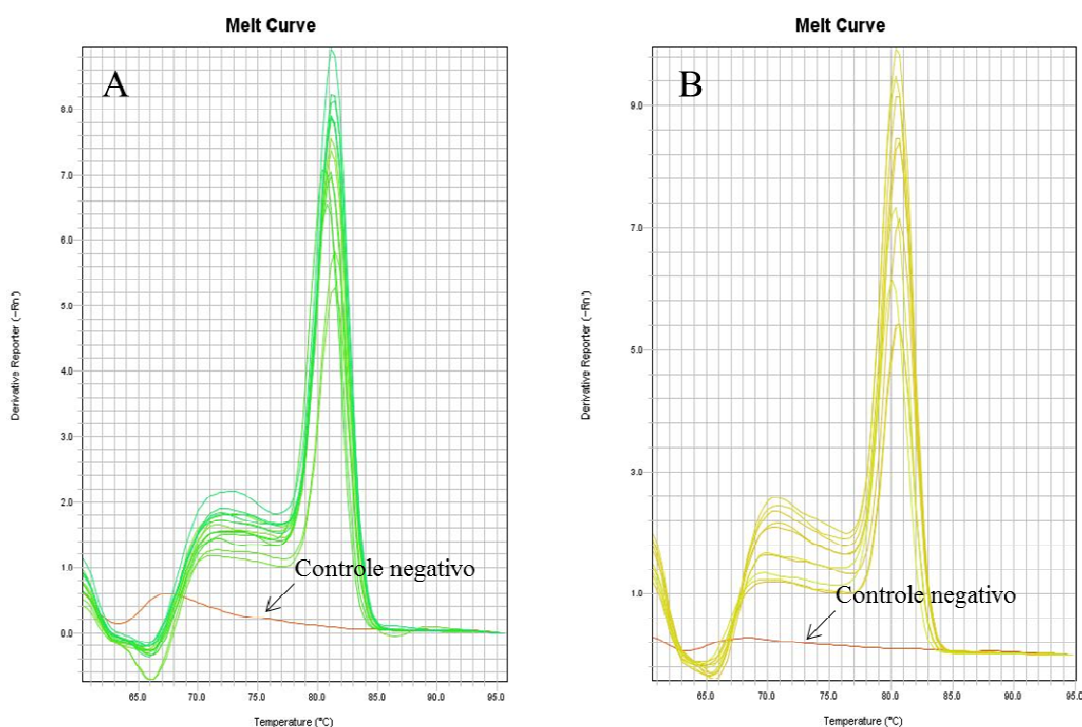
336 A qPCR executada obteve resultados de *slope* de -3,337, com $R^2 = 0,995$ e eficiência de
 337 99,387 para o gene SRY (cromossomo Y) e *slope* de -3,583, com $R^2 = 0,988$ e
 338 eficiência de 90,163 para o gene Fator IX (cromossomo X), representados pela curva
 339 padrão na Figura 1. A amplificação das amostras, nos dois genes utilizados seguiu o
 340 mesmo padrão (Figura 2).
 341



342
 343 Figura 1. Curva padrão da qPCR do DNA extraído de espermatozoides caninos, para o
 344 gene SRY (A) e Fator IX (B) de *Canis lupus familiaris*.

345

346



347
 348 Figura 2. Curva de amplificação da qPCR de amostras de DNA, obtidas de
 349 espermatozoides canino, para o gene SRY (A) e Fator IX (B) de *Canis lupus familiaris*.
 350 Controle negativo indicado pela seta.

351 Discussão

352 A sexagem espermática por citometria de fluxo se destacou como biotecnologia
353 reprodutiva, principalmente na criação de bovinos (O'Brien et al. 2009). No entanto,
354 apesar de eficiente, esta técnica é considerada de difícil aplicação em vista do custo
355 elevado do equipamento e baixa recuperação espermática. Uma alternativa é a
356 centrifugação em gradiente de densidade que, ao contrário, é de simples execução e não
357 exige grandes investimentos em equipamentos (Lima et al. 2011).

358 As técnicas de citometria de fluxo e centrifugação em gradiente de densidade já foram
359 reportadas, com sucesso, em outras espécies, para a separação de células espermáticas
360 (Check et al. 2000; Garner e Seidel Jr 2003; Lima et al. 2011; Matás et al. 2011). Isto
361 significa que o sêmen foi eficientemente separado para conter uma amostra capaz de
362 produzir uma prole masculina ou feminina de acordo com a necessidade (Fernandes e
363 Rodrigues 2012; Interural 2012).

364 Em cães, os estudos são escassos, mas as duas técnicas já foram descritas nesta espécie.
365 Silva (2013) foi o único a descrever a centrifugação em gradiente de densidade de
366 Percoll[®] em cães, e revelou alta recuperação espermática, mas, como no presente
367 estudo, o enriquecimento do cromossomo X não foi obtido (49,3% de X vs 50,7% de Y
368 pós-centrifugação). Apesar disto, este autor encontrou diferença estatística nas duas
369 populações espermáticas, o que não corrobora com os resultados obtidos no mesmo
370 gradiente nesse estudo.

371 Apesar do sucesso da sexagem espermática por meio da citometria de fluxo em cães,
372 com recuperação de 88 a 93% de X e 86 a 93% de Y, a quantidade de espermatozoides
373 recuperados (60 a 200×10^4) após o procedimento (Oi et al. 2013) inviabilizaria a
374 inseminação artificial. Contrariamente, a centrifugação nos gradientes de densidade
375 estudados no presente estudo e nos de Silva (2013), utilizando apenas o Percoll[®], foram
376 capazes de recuperar em torno de 50% das células submetidas ao processo. Esta taxa de
377 recuperação também foi superior as citadas por outros autores, utilizando diferentes
378 concentrações e meios gradientes para centrifugação (Shastry et al. 1977; Check et al.
379 2000; Chantler 2000; Resende et al. 2009; Matás et al. 2011), com uma taxa média de
380 recuperação espermática no Percoll[®] de 5 a 25% (Resende et al. 2009; Lima et al. 2011;
381 Oliveira et al. 2011; Silva 2013).

382 Se o volume seminal obtido não tivesse sido dividido em alíquotas de 100×10^6 para cada
383 gradiente de densidade e tivesse sido utilizado o seu total, a taxa média de recuperação
384 espermática seria de $318,6 \times 10^6$ para o Percoll[®], de $355,4 \times 10^6$ para o Percoll[®] associado

385 ao Nycodenz[®] e de $449,8 \times 10^6$ para o Ficoll. Taxas estas muito superiores às encontradas
386 por Silva (2013) que relatou taxa média de recuperação variando entre 7,7 e 251×10^6
387 para as células espermáticas de cão submetidas a centrifugação em gradiente de
388 densidade de Percoll[®]. A taxa mínima para inseminação artificial intravaginal com
389 sêmen fresco em cães é de 50×10^6 (Concanon e Batista 1989), e nesse aspecto todos os
390 gradientes superaram as expectativas e poderiam ser utilizados para este fim.

391 Apesar da semelhante taxa de recuperação entre os gradientes neste estudo, apenas o
392 Percoll[®]/Nycodenz[®] e Ficoll recuperam células com motilidade total adequada, sendo
393 superior no Ficoll[®], porém nenhum dos gradientes foi capaz de manter a motilidade
394 inicial.

395 De acordo com o nosso conhecimento, não há nenhum estudo sobre a diferença de
396 densidade entre os cromossomos X e Y da espécie canina, mas mesmo em bovinos, tal
397 diferença é mínima, de apenas $7 \times 10^{-4} \text{g/cm}^3$ ou 0,06% (Windsor et al. 1993; Chandler et
398 al. 1999). Acreditamos que em cães a diferença também seja ínfima, só sendo possível a
399 separação por meio do uso de gradientes com alta resolução de densidade, e que os
400 meios utilizados neste trabalho não tiveram essa característica, sendo inapropriados.

401 Em relação às características espermáticas, as células do sêmen fresco foram superiores
402 as submetidas à centrifugação, independente do gradiente, exceto para alguns
403 parâmetros de motilidade e atividade mitocondrial que não variaram, demonstrando que
404 a centrifugação nos gradientes de densidade utilizados neste estudo não foi capaz de
405 preservar integralmente tais características. Já na espécie bovinas, estudos relatam que a
406 viabilidade das células espermática é mantida, uma vez que não altera a morfologia das
407 mesmas e inclusive pode aumentar sua motilidade (Blottner et al. 1993; Watkins et al.
408 1996; Lima 2005).

409 Em vista dos resultados, os gradientes utilizados promoveram alterações nas
410 características espermáticas, pois se esperava que a motilidade e o vigor fossem
411 elevados após a centrifugação, já que há retenção das células defeituosas nas porções
412 superiores dos gradientes (Check et al. 2000; Mc Cann e Chantler 2000; Resende et al.
413 2009; Oliveira et al. 2011). Para a realização da inseminação artificial com
414 possibilidade de sucesso, o valor mínimo adequado é motilidade de 50% com sêmen
415 fresco (Concannon; Batista 1989) e este valor só foi alcançado pelos espermatozoides
416 submetidos à centrifugação em gradiente de Ficoll (62,2%). Aqueles submetidos ao
417 gradiente de Percoll[®] isolado e associado ao Nycodenz[®] apresentaram motilidade média
418 total de 13,9% e 41,6%, respectivamente, inviáveis para a inseminação.

419 O Percoll[®] isolado, quando comparado aos outros dois gradientes Percoll[®]/Nycodenz[®] e
420 Ficoll, foi inferior na maioria dos parâmetros avaliados, sendo o gradiente menos viável
421 em relação à manutenção das características espermáticas, dentre os três estudados. Fato
422 curioso, pois segundo Silva (2013), apesar de ter reduzido a motilidade e o vigor
423 espermático, o Percoll[®] manteve a integridade da membrana plasmática, a porcentagem
424 de células morfológicamente normais e porcentagem de defeitos menores, em relação
425 ao sêmen fresco. Ademais, documentou a redução na porcentagem de defeitos maiores,
426 o que também já foi descrito em células espermáticas de outras espécies submetidas à
427 centrifugação em gradiente de Percoll[®] (Mc Cann e Chantler 2000; Oliveira et al. 2011).
428 Neste estudo, a centrifugação em gradientes de densidade não alterou a morfologia
429 espermática de cães.

430 O resultado do atual estudo corrobora com o de Silva (2013), a centrifugação em
431 gradiente de densidade de Percoll[®] não promoveu o desvio sexual de espermatozoides
432 contendo cromossomos X e Y baseada na diferença de densidade entre os dois. Apesar
433 disto, em humanos, a associação de Percoll[®] com Nycoprep[®] (atualmente Nycodenz[®])
434 revelou amostras contendo 94% de espermatozoides com cromossomo X, confirmadas
435 por FISH e comparáveis aos resultados da separação por citometria de fluxo (Andersen;
436 Byskov 1997), resultado este não observado no atual experimento, que não resultou
437 enriquecimento de nenhum dos cromossomos sexuais.

438 Em relação ao Ficoll, mesmo os espermatozoides submetidos à centrifugação com esse
439 gradiente terem demonstrado resultados superiores aos outros dois gradientes, a
440 motilidade e viabilidade também foram abaixo do esperado. Segundo Davis e Halliday
441 (1977) essa redução deve-se principalmente a centrifugação e não ao gradiente de
442 densidade, pressupondo que a ação sofrida pelos espermatozoides na centrifugação seja
443 a responsável por afetar a sua qualidade e capacidade fertilizante. A técnica de
444 separação espermática por centrifugação em gradiente de Ficoll se baseia no fato de que
445 os espermatozoides contendo o cromossomo X têm mais massa do que aqueles
446 contendo o cromossomo Y e por isso sedimentam mais facilmente. No entanto, Shastry
447 et al. (1977) relatou o inverso ao utilizar Ficoll como gradiente. No atual estudo não foi
448 observado enriquecimento de nenhuma célula espermática, independente do tipo de
449 cromossomo.

450 Em bovinos, a sexagem espermática por meio da centrifugação em gradiente
451 descontínuo de densidade de Percoll foi relatada com sucesso, resultando em
452 enriquecimento de espermatozoides X de 55,7% (Kobayashi et al. 2004) a 74,3% (Lima

453 et al. 2000). Em humanos, com o mesmo gradiente, os resultados variaram de 55%
454 (Wang et al. 1994) a 94% (Lizuka et al. 1987) de seleção de espermatozoides X após a
455 centrifugação, resultados superiores aos encontrados neste trabalho com a espécie
456 canina.

457 Uma técnica segura e confiável para a quantificação de espermatozoides X e Y em
458 amostras de sêmen e a validação de técnicas de sexagem de espermatozoides é a qPCR
459 (Joerg et al. 2004; Parati et al. 2006; Puglisi et al. 2006). De acordo com o nosso
460 conhecimento, nosso trabalho é o segundo a utilizar qPCR para validação da sexagem
461 de espermatozoides caninos submetidos à centrifugação em gradiente de densidade.

462 Essa técnica de validação da sexagem espermática foi a escolhida para este estudo
463 devido alto grau de acurácia, repetibilidade e reprodutibilidade (Joerg et al. 2004; Parati
464 et al. 2006), além da possibilidade de uso em larga escala, não necessita de equipamento
465 de citometria de fluxo e principalmente necessita de uma pequena alíquota da amostra,
466 o que no caso do sêmen, especialmente do cão, é de interesse, devido ao baixo volume e
467 concentração (Sverzuc 2011).

468 No entanto, segundo Resende (2007), os componentes do Percoll[®], como a sílica e o
469 PVP, podem afetar a extração do DNA ou as amplificações na qPCR, mesmo após
470 sucessivas lavagens. Da mesma maneira, Percoll[®] a 80% promove variabilidade dos
471 resultados durante a confirmação da sexagem pela citometria de fluxo (Puglisi et al.
472 2006). Acreditamos que tal fato pode ter ocorrido neste trabalho após a centrifugação
473 em gradiente de densidade quando utilizado o Percoll[®] isolado ou não, por
474 contaminação do DNA e/ou inibição da PCR, levando a resultados suspeitos na
475 validação da sexagem espermática. De fato algumas amostras não se amplificaram
476 durante a PCR, mas a extração de DNA foi realizada com sucesso utilizando-se o
477 protocolo descrito, conforme os dados de qualidade das amostras e da quantidade de
478 DNA extraído.

479 A citometria de fluxo não utiliza gradientes de densidade e poderia ter sido a técnica de
480 escolha para validação do desvio sexual dos espermatozoides, mas também não é uma
481 técnica viável comercialmente, por ser muito dispendiosa. Ademais, no caso da espécie
482 canina, as diferenças no tamanho dos espermatozoides em relação aos de bovinos, pode
483 dificultar a leitura e direcionamento da cabeça espermática pelo citômetro. Ainda, nos
484 bovinos, a porcentagem de espermatozoides recuperados após citometria de fluxo é
485 relativamente baixa, em média 10 a 15% (Garner 2006) e nos cães é ainda menor, de 0,3
486 a 1% (Oi et al. 2013), não justificando o seu uso.

487 Alguns autores desestimulam a utilização da centrifugação em gradiente de densidade
488 como método de sexagem espermática devido a baixa eficiência na separação (Lin et al.
489 1998; Check et al. 2000), o que para as espécies analisadas até então, uníparas, não foi
490 favorável, uma vez que mesmo com 70% de possibilidade de nascimento de fêmeas no
491 rebanho, essa taxa ainda é baixa devido a possibilidade de 30% nascerem machos. No
492 entanto, cães são multíparos, e mesmo com o nascimento de 30% de machos, a prole
493 terá maior número de fêmeas, favorecendo o mercado, já que na maioria das raças
494 caninas, as fêmeas são mais valorizadas.

495

496 **Conclusões**

497 Embora neste estudo a quantidade de espermatozoides recuperados não tenha variado
498 entre os gradientes, nenhum dos métodos promoveu a sexagem espermática,
499 enriquecendo as amostras com células contendo os cromossomos X e Y, evidenciando a
500 necessidade de mais estudos e aprimoramento para que a aplicação comercial dessa
501 biotecnologia seja viável na espécie canina.

502

503 **Referências**

504 Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, 2003: New semen quality scores developed by
505 principal component analysis of semen characteristics. *J Andrology* **24**, 343-352.

506

507 Andersen CY, Byskov AG, 1997: Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells
508 by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ
509 hybridization of the Y-chromosome. *A Obstet Gynecol Scand* **76**, 131-134.

510

511 Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM, 2003: Determinação da integridade da
512 membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de
513 citometria de fluxo. *Acta Sci Vet* **31**, 226-227.

514

515 Blom E, 1972: The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for
516 a new classification of the bull spermogram. In: VII Symposio Internationale de
517 Zootechia, Milão, Itália, pp.125-139.

518

519 CBRA, 2013: Manual prático para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.
520 3ªed., Belo Horizonte: Editora do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p.

521

522 Classens OE, Menkveld R, Harrison KL, 1998: Evaluation of three substitutes for
523 Percoll™ in sperm isolation by density gradient centrifugation. *Human Reproduction*
524 **13**(11), 3139–3143.

525

526 Cran DG, 2007: XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs.
527 *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 475-491.

528

529 Davis NB, Halliday TR, 1977: Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to
530 separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature* **269**, 58-60.

531

532 Freitas CP, 2007: Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado.
533 2007. 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
534 Universidade Estadual Paulista.

535

536 Freitas Dell-Aqua, CPF, 2011: Técnicas avançadas na análise de alterações morfo-
537 funcionais de sêmen eqüino. 2011. 78f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina
538 Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

539

540 Garner DL, 2006: Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* **65**,
541 943-957.

542

543 Garner DL, 2009: Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and
544 Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* **71**, 11-21.

545

546 Hegde UC, Shastry PR, Rao SS, 1977: A simple and reproducible method for separating
547 Y-bearing spermatozoa from human semen. *Ind J Med Res* **65**(5), 738-740.

548

549 Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001: Evaluation of the Hamilton Thorne computer
550 based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* **55**, 733-749.

551

552 Jafar SI, Flint APF, 1996: Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology* **46**,
553 191-200.

554

- 555 Joerg H, Asai M, Graphodatskaya D, Janett F, Stranzinger G, 2004: Validating bovine
556 sexed semen samples using quantitative PCR. *J Anim Breed Genet* **121**, 209–215.
557
- 558 Johnson LA, 1994: Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. *Oxford*
559 *Reviews of Reproductive Biology* **16**, 303-326.
560
- 561 Johnson LA, 1995: Sex preselection by flow cytometry separation of X and Y
562 chromosome bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod Fertil Dev*
563 **7**(4), 893-903.
564
- 565 Johnson LA, Welch GR, 1999: Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of
566 X- and Y-sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* **53**, 1323-1413.
567
- 568 Johnson LA, 2000: Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-
569 theart. *Anim Reprod Sci* **60**, 93-107
570
- 571 Lima VFMH, 2006: Espermatózoide sexado bovino: quando utilizá-lo? *Acta Scie Vet*
572 **34**, 213-224.
573
- 574 Marquezi D, 2007: Algo de novo no reino dos humanos. *Galileu* **197**, 41-53.
575
- 576 Mc Cann CT, Chantler E, 2000: Properties of sperm separated using Percoll™ and
577 IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and
578 the acrosome reaction. *Int J Androl* **23**, 205–209.
579
- 580 Moce E, Graham JK, Schenk JL, 2006: Effect of sex-sorting on the ability of fresh and
581 cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology* **66**, 929–
582 936.
583
- 584 O'Brien JK, Steinman KJ, Robeck TR, 2009: Application of sperm sorting and
585 associate reproduction technology for wildlife management and conservation.
586 *Theriogenology* **71**, 1330-1331.
587
- 588 Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kano Y, Takeshima T, Tauchi K,

- 589 Nagashima H, 1988: Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common
590 with mammalian species? *Theriogenology* **239** (5), 1083-1089.
591
- 592 Oi M, Yamada K, Hayakawa H, Suzuki H, 2013: Sexing of dog sperm by fluorescence
593 in situ hybridization. *J Reprod Dev* **59** (1), 92-96.
594
- 595 Papa FO, Alvarenga MA, Carvalho IM, Bicudo SD, Ramires PRN, Lopes MD, 1988:
596 Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão
597 (*Stryphnodendrum barbatiman*). *Arq Bras Med Vet Zoo* **40**, 115–123.
598
- 599 Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A, 2006: Sex ratio determination in bovine
600 semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* **66**, 2202-2209.
601
- 602 Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL, 1988: Capacitation on bovine sperm
603 by heparin. *Biol Reprod* **38**, 1171-1180.
604
- 605 Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL, 1991: A simple staining method for evaluating
606 acrossomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med* **22**, 87-95.
607
- 608 Pukazhenthii B, Comizzoli P, Travis AJ, Wild DE, 2006: Applications of emerging
609 technologies to the study and conservation of threatened and endangered species.
610 *Reprod Fertil Dev* **18**, 77–90.
611
- 612 Resende MV, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lucio AC, Lima VFMH, 2009:
613 Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll™ and
614 optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Ci
615 Anim Bras* **10**(2), 581-587.
616
- 617 Seager SWJ, Platz CC, 1977: Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Vet
618 Clin North Am* **7**, 757-764.
619
- 620 Seidel Jr GE, 2003: Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology,
621 and biology animal. *Reprod Sci* **79** (3-4), 145-156.
622

- 623 Seidel Jr GE, 2007: Overview of sexing sperm. *Theriogenology* **68** (3), 443–446.
624
- 625 Shastry PR, Hegde UC, Rao SS, 1977: Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient
626 to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature* **269**, 58-60.
627
- 628 Silva CBAR, 20013: Sexagem espermática por gradiente de densidade de Percoll® em
629 cães. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Franca.
630
- 631 Taylor TM, 2005: Comparing calf sex ratio and semen sex ratio determined by
632 conventional PCR. Dissertation (Master) - Louisiana State University and Agricultural
633 and Mechanical College, Program in Animal and Dairy Sciences, Southern Arkansas
634 University, 10-11.
635
- 636 Telford DJ, Beard AP, Franks JR., 2003: The potential adoption and use of sexed semen
637 in UK suckler beef production. *Liv Prod Sci* **84**, 39-51.
638
- 639 Welch GR, Johnson LA, 1999: Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex
640 ratio of flow sorted X and Y sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* **52**,
641 1343-1352.