

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A  
COMPOSIÇÃO PROTEÍCA DA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS**

CAROLINE SCOTT

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A  
COMPOSIÇÃO PROTEÍCA DA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS**

CAROLINE SCOTT

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós Graduação em  
Biotecnologia Animal para obtenção de  
título de Mestre

Orientador: Dr. José Antônio Dell'Aqua  
Junior

Nome do autor: Caroline Scott

Título: EFEITOS DA SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A COMPOSIÇÃO PROTEÍCA DA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucilene Delazari dos Antos

Membro

Departamento de Doenças Tropicais FMB – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 17 de janeiro de 2014

## DEDICO

*Aos meus pais Marcos e Zenaide por serem a minha base. Minha irmã Cybele e meu cunhado Fernando por estarem sempre presentes mesmo longe. Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e por acreditarem no meu sonho.*

**AGRADEÇO:**

*São tantos agradecimentos que é difícil não se esquecer de alguém...*

*Primeiramente a Deus por ser quem me traz tranquilidade quando recorro nos meus momentos de necessidade*

*Ao meu orientador José Antônio, pela orientação e por ter me dado a oportunidade de estar onde estou.*

*A minha querida amiga, professora e eterna orientadora Fabiana por acreditar no meu potencial desde a graduação, pelos ensinamentos e pela ajuda que tenho sempre.*

*A Lucilene por nunca ter me negado ajuda quando eu precisei*

*Aos funcionários e amigos do Departamento de Reprodução Animal e do CEVAP.*

*Ao professor Arlindo e sua equipe por ter me recebido tão bem, e me ensinado a desvendar um pouquinho o temido PDQest.*

*A minha amiga Priscilla, pela amizade, ajuda, e as várias risadas, esperando a eletroforever que nunca acaba!*

*A Amanda minha irmã de coração, por ter ficado sempre do meu lado quando eu precisei, (e por sempre lavar a louça!!!).*

*Aos amigos de uma forma geral, de Franca e Botucatu que entenderam minha ausência e sempre torceram pelo meu sucesso.*

*Aos animais, que mesmo sem nenhum contato neste trabalho, sem eles não seria possível.*

*A FAPESP pela concessão da bolsa*

*É uma enorme lista para agradecer, não queria ser injusta e esquecer alguém, então agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram e torceram por mim.*

## EPÍGRAFE

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*

*Cora Coralina*

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
1.1. Importância da seleção do sexo em mamíferos .....	2
1.2. Dados históricos da seleção do sexo .....	3
1.3. Espermatogênese e a síntese proteica .....	5
1.4. Bases fisiológicas para sexagem espermática .....	7
1.4.1. Diferenças no conteúdo de DNA .....	7
1.4.2. Diferenças baseadas nas proteínas de membrana .....	10
1.5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SEXADO .....	13
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>14</b>

### CAPÍTULO 2

1.1. Hipótese .....	1
1.2. Objetivo geral .....	1
2.3. Objetivo específico .....	1

### CAPÍTULO 3

<b>EFEITOS DA SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A COMPOSIÇÃO PROTEÍCA DA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS .....</b>	<b>24</b>
--	-----------

## RESUMO

SCOTT, C. Efeitos da sexagem por citometria de fluxo sobre a composição proteica da membrana de espermatozoides bovinos, 2014. 53. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A sexagem de espermatozoides, para a obtenção de doses de sêmen com alta percentagem de gametas portadores do cromossomo X ou Y, torna ainda mais relevante o papel da inseminação artificial na maximização do progresso genético entre gerações, na produtividade e retorno econômico em algumas atividades pecuárias, na reprodução assistida em mamíferos e no aconselhamento genético da espécie humana. Várias são as técnicas descritas na tentativa de separar os espermatozoides por sexo, porém todas ainda estão em processo de adequação e nenhuma oferece 100% de acuidade. Baseando-se na hipótese que durante o processo de espermatogênese existem proteínas que se expressam diferentemente na membrana de espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y, a técnica por separação utilizando anticorpos sexo-específicos vem sendo bastante estudada. Dessa forma este trabalho objetivou em estudar as proteínas de membrana expressas nos espermatozoides sexados e não sexados.

**Palavras chave:** célula-espermática, proteína-membrana, sêmen-sexado, touro

## ABSTRACT

SCOTT, C. Effects of sexing by flow cytometry on the composition of sperm bovine membrane protein. Botucatu, 2014. 53. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The sexing of sperm, to obtain doses of semen with a high percentage of gametes carrying the X or Y chromosome, even more relevant the role of artificial insemination in maximizing the genetic progress between generations, productivity and economic returns in some farming activities; in assisted reproduction in mammals, and in genetic counseling of the human species. Several techniques are described in an attempt to separate the sperm by sex, but all are still in process and no fitness offers 100% accuracy. Based on the hypothesis that during the process of spermatogenesis there are proteins that are differently expressed in the sperm membrane carrying the X or Y chromosome the separation technique using sex-specific antibodies have been extensively studied. Thus this work aimed to study membrane proteins expressed in sexed sperm and not sexed.

**Key words:** bull, protein, sexed-semen, sperm cells

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro está em constante crescimento e de acordo com o último censo nacional realizado em 2010 o Brasil possui mais de 200 milhões de cabeças (IBGE, 2010). Parte deste crescimento se deve as biotécnicas aplicadas à reprodução animal, dentre essas, a inseminação artificial mais recentemente, utilizando-se espermatozoides sexados.

A aplicação do sêmen sexado nos diferentes sistemas de produção de bovinos tem aumentado nos últimos anos e a biotecnologia vem sendo utilizada na produção comercial. O uso desta biotécnica esta contribuindo para o desenvolvimento mais acelerado dos programas de melhoramento genético. Dentre as possibilidades de sua aplicação, as relacionadas com a produção de embriões são as que apresentam maior potencial, contudo a aplicação da sexagem a campo, associada à inseminação artificial em tempo fixo tem gerado discussão em relação as suas vantagens e custo-benefício.

A seleção do sexo da progênie em rebanhos de leite e carne pode incrementar o sistema de produção direcionando o nascimento de animais para o sexo desejado. Várias técnicas são descritas para a separação de espermatozoides X e Y, e todas estão em processo de adequação uma vez que ainda promovem danos irreparáveis aos espermatozoides e ao seu DNA (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

A técnica de separação espermática por citometria de fluxo é atualmente a única que apresenta resultados satisfatórios para produção comercial de doses sexadas. Sua eficácia na seleção para o sexo proposto é em torno de 90%, resultando em nascimentos acima dos 85% para o sexo selecionado. Apesar da citometria de fluxo ser um método funcional e com resultados satisfatórios comprovados, ainda é uma técnica com alto custo e a taxa de prenhez é baixa, quando comparada a do sêmen convencional, em vista dos danos causados aos espermatozoides e a menor concentração de células espermáticas por palheta (BONDAN, 2012; DEJARNET, 2012).

Baseado nas diferenças proteicas na superfície da membrana dos espermatozoides X e Y, a sexagem espermática tem sido proposta pela utilização de anticorpos sexo-específicos. Esta técnica tem sido proposta por vários autores, porém os resultados ainda continuam inconclusivos, desta forma o

presente trabalho objetivou analisar e identificar as proteínas da membrana dos espermatozoides X e Y de bovinos.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Importância da seleção do sexo em mamíferos**

A partir da década de 80, com o aprimoramento e a difusão das técnicas de inseminação artificial associada a sexagem de espermatozoides e transferência de embriões dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda de sistemas de produção mais eficientes, o estudo e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo de espermatozoides e embriões pré-implantados em espécies de interesse zootécnico foi intensificado incrementando o melhoramento genético animal pelo aumento do progresso genético anual em até 25% para produção de leite e carne, em sistemas nos quais a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR et al., 1985; VAN VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992; HOHENBOKEN, 1999).

A seleção do sexo poderá contribuir para o aumento da rentabilidade na produção animal e no mercado de animais de companhia incluindo àqueles destinados a competições esportivas (SEIDEL; JOHNSON, 1999) devido à possibilidade de se produzir descendentes com o sexo visando à vantagem da diferença de características entre machos e fêmeas para mercados específicos (RORIE, 1999). Os equinos oferecem o melhor exemplo em vários países, alguns mercados demandam, por exemplo, a produção de fêmeas de raças utilizadas para polo (SEIDEL; JOHNSON, 1999). A sexagem de espermatozoides decai ainda aos seres humanos com interesse no controle de doenças ligadas ao sexo e aos animais selvagens auxiliando no manejo dos que estão em cativeiro (MAXELL et al., 2004). Há ainda o interesse na sexagem em animais de pesquisa utilizando o nascimento do sexo relacionado ao trabalho experimental (SEIDEL, 2003).

Historicamente a inseminação artificial em vacas data do fim da década de 30 e avanços significativos ocorreram desde então. O sucesso da técnica depende do bom manejo e compreensão do processo reprodutivo da vaca. Com o desenvolvimento da criopreservação do sêmen na década de 50 surgiu a

oportunidade de se realizar, na propriedade rural a inseminação artificial. Ainda assim, o sucesso dependia das habilidades de gerenciamentos adicionais. O conhecimento prévio dos princípios básicos foi fundamental na adaptação da nova tecnologia. Com o desenvolvimento da sincronização do estro no fim da década de 70 e começo da década de 80 surgiu a oportunidade da inseminação de um rebanho grande em um curto período de tempo (PACE, 1990).

Dados publicados pela ASBIA descrevem que em 2011 foram vendidas cerca de 12 milhões de doses de sêmen, e acredita-se que entre 600 a 800 mil doses são de espermatozoides sexados embora não há dados estatísticos para esse parâmetro (MILKPOINT, 2012). Uma dose de sêmen sexado pode custar cerca de quatro vezes mais que uma dose convencional, porém para alguns animais de destaque essa diferença pode chegar a mais de 20 vezes (LAGOA DA SERRA, 2013).

A sexagem de espermatozoides visa à máxima produção com menor custo e a possibilidade de produzir doses inseminantes com espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y especificamente de acordo com a necessidade de cada programa de melhoramento genético (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

Métodos mais eficientes de sexagem de espermatozoides surgem a cada dia, melhorando a base científica na tentativa de elucidar as questões nesse aspecto (LUCIO, 2007).

## **1.2. Dados históricos da seleção do sexo**

O estudo da diferenciação sexual remota dos gregos antigos (470-403 a.C.) que sugeriram que no testículo direito se produzia machos e no esquerdo fêmeas (GARNER; SEIDEL, 2008), nesta época recomendava-se a castração unilateral na tentativa de ter os filhos do sexo desejado. A primeira descrição do espermatozoide foi feita por Hipócrates que afirmava que este tipo celular era produzido por ambos os sexos e que o sexo da progênie dependia da vitalidade dos pais (KLINK; RATH, 2006).

Por volta do século XV, Anton van Leeuwenhoek propôs os animálculos espermáticos, ou seja, pequenos animais pré-formados encontrados no espermatozoide. Posteriormente, postulou-se a existência de um ser humano dentro dos espermatozoides, o homúnculo, para o qual o ambiente uterino

forneceria as condições necessárias para o seu crescimento, dando origem ao indivíduo adulto. Essa teoria foi chamada de animalculismo ou teoria espermista (BARROS; CURCIO, 2012; CARVALHO et al., 2012).

Somente em 1910, com a descoberta dos cromossomos sexuais, foram estudadas as estruturas responsáveis em determinar o sexo dos gametas, possibilitando a separação dos espermatozoides X e Y (SEIDEL; GARNER, 2002). A primeira teoria da evolução dos cromossomos sexuais é de Müller, que determinou que os cromossomos X e Y evoluíram a partir de um par de autossomos. Inicialmente acreditava-se que o sexo era determinado apenas pelo cromossomo X, dessa forma as fêmeas eram classificadas como XX, e os machos eram classificados como X0. Em 1914, descobriu-se que o sexo masculino estava associado ao cromossomo X e um outro cromossomo que, incapaz de recombinar, acumulou mutações deletérias, eliminando todos os genes, e assim os machos foram denominados XY. Essa teoria foi fundamental para o estudo da evolução dos cromossomos sexuais há quase 100 anos (MEDALHA, 2008; BELLOT; PAGE, 2009).

Em 1979, Morruzi sugeriu pela primeira vez que o DNA poderia ser um fator diferencial nos espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y, e essa poderia ser a base da separação espermática. Após um longo período de insucesso, um grande avanço ocorreu em 1981, quando o conteúdo de DNA pôde ser mensurado, porém inicialmente havia uma alta taxa de morte ou dano celular. Os avanços subsequentes na citometria de fluxo permitiram o uso de um número mínimo de células na inseminação artificial, e sua posterior criopreservação para a comercialização para o rebanho bovino (GARNER; SEIDEL, 2008).

Johnson et al. (1989) reportaram em seus estudos o uso do DNA como marcador da separação dos espermatozoides portadores do cromossomo X e Y pela citometria de fluxo. Em uma reanálise dos espermatozoides já separados encontraram 86% e 81% de pureza para X e Y, respectivamente. Coelhas foram inseminadas cirurgicamente com os espermatozoides sexados e a taxa de gestação encontrada foi de 94% de nascimento de fêmeas e 81% de nascimento de machos. Diversos estudiosos baseados na ciência da computação, biofísica, biologia celular, fisiologia aplicada deram continuidade aos estudos sobre o tema (GARNER; SEIDEL, 2008).

A seleção do sexo já foi estudada em diferentes espécies de interesse

zootécnico e duas principais rotas foram descritas, a seleção do sexo nos espermatozoides (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; SEIDEL, 2003) e a identificação do sexo em embriões previamente a implantação (MOREIRA-FILHO et al., 2000; RAMALHO et al., 2000).

Para a pré-seleção do sexo antes da concepção, o método eficaz é a separação de espermatozoides portadores do cromossomo X ou do cromossomo Y (MAXWELL et al., 2004). Para a bovinocultura essa seleção representa um grande potencial para o melhoramento genético, aliado a inseminação artificial, suprimindo a demanda do mercado (PARATI et al., 2006).

### **1.3. Espermatogênese e a síntese proteica**

A espermatogênese é o processo de diferenciação celular em que as células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) sofrem várias divisões mitóticas e meióticas formando os espermatozoides (BARTH; OKO, 1989). Este processo ocorre nos túbulos seminíferos e é dividido em três fases. A primeira fase é denominada fase de proliferação, a qual se inicia na periferia dos túbulos seminíferos e consiste em todas as divisões mitóticas da espermatogônia. Algumas delas são direcionadas para a formação de um tipo de célula primitiva para a renovação das células germinativas (SENGER, 2003).

A segunda fase é conhecida como fase meiótica e ocorre no lúmen dos túbulos seminíferos, envolvendo espermatócitos primários e secundários. Ao final dessa fase há produção de espermátides haploides. A terceira e última fase, a fase de diferenciação, não é caracterizada por divisões celulares. É uma fase definida como espermiogênese, na qual as espermátides redondas sofrem transformações morfológicas e dão origem aos espermatozoides. Durante as duas primeiras fases as células são conectadas por pontes intercelulares, dessa forma o citoplasma de grupos do mesmo tipo celular são conectados (ROOSEN-RUNGE, 1977). O motivo pelo qual essas pontes intercelulares se mantêm não é totalmente elucidado, mas talvez a comunicação entre as células possa contribuir para um desenvolvimento sincronizado do grupo celular (SENGER, 2003).

Os genes expressos durante o processo de espermatogênese codificam as proteínas necessárias para os processos específicos para diferentes fases do desenvolvimento das células germinativas. Alguns genes codificam

proteínas com papéis essenciais na estrutura ou funções específicas das células espermatogênicas (EDDY, 1998).

Os espermatozoides são células que realizam os processos de transcrição e tradução de maneira silenciosa, e são capazes de passar por transformações que ocorrem por modificações pós-traducionais durante a maturação no epidídimo e capacitação, contudo não se conhece claramente as alterações bioquímicas envolvidas nesse processo (BAKER et al., 2012). São células traducionalmente silenciosas em consequência da alta condensação da cromatina e assim há pouco ou nenhum citoplasma capaz de suportar a tradução. Porém, essas células possuem um conjunto complementar de mRNAs e que em certas condições são capazes de serem traduzidos (MILLER; OSTERMEIER, 2006). O espermatozoide humano contém várias moléculas de RNA mensageiro (mRNA) que podem ser consideradas específicas de determinados passos da espermatogênese. Cerca de 3000 transcritos são descritos no genoma haploide paternal, porém o papel desses transcritos na espermatogênese ainda não está claro (MILLER et al., 2005).

Após a completa divisão meiótica os espermatozoides recém-formados, portadores dos cromossomos X e Y não se diferem na composição do citoplasma ou proteínas de membrana. Portanto a composição proteica dos espermatozoides X e Y pode somente ser diferente quando os genes dos cromossomos são expressos após a meiose e quando os produtos gênicos são confinados as células haploides individuais, não ocorrendo troca de material genético com outras espermátides através das pontes intercelulares (HENDRIKSEN, 1999).

Acreditava-se que o RNA encontrado em amostras contendo espermatozoides estivesse relacionado à contaminação por células somáticas e/ou espermatozoides imaturos, pois ambos contêm quantidades elevadas de RNAs comparado aos espermatozoides aptos à fertilização (BOERKE et al., 2007). Entretanto, atualmente já existe uma forte evidência que os RNAs espermático pode potencialmente afetar o fenótipo da prole. Esse fenômeno epigenético envolve a transmissão de elementos epissomais extra-cromossomais. Um estudo mostra que o RNA ainda é encontrado após a passagem das células espermáticas em gradientes de densidade resultando em uma fração celular que possui uma tradução silenciosa e desprovida de RNA ribossômico (rRNA)

citossólico (BOERKE et al., 2007). Dessa forma é encontrado no oócito fertilizado uma quantidade relativamente pequena de RNA paternal (MILLER; OSTERMEIER, 2006).

Feugang et al. (2010) detectaram cerca de 415 transcritos diferenciais em amostras de touros de alta e baixa fertilidade. Esses transcritos foram associados com diferentes funções celulares e processos biológicos. Espermatozoides de touros de alta fertilidade continham maior concentração de genes associados a tradução de proteínas de membrana e de espaço extracelular. Contrariamente, espermatozoides de touros com baixa fertilidade continham menor quantidade de fatores de transcrição e tradução.

Foram encontrados por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa, seis transcritos presentes no espermatozoide que não foram encontrados no oócitos de humanos não fertilizados. Esses transcritos foram relacionados a fertilização, no zigoto e desenvolvimento embrionário. Após um ensaio de penetração a clusterina e a protamina, de origem espermática, persistiram no zigoto formado, mostrando a participação do espermatozoide na fertilização (OSTERMEIER et al., 2004). Várias linhas de pesquisa afirmam que os espermatozoides contribuem mais que seu DNA no processo de fertilização. Essas células também contribuem com uma complexa população de mRNA alguns deles que codificam proteínas cruciais para o desenvolvimento inicial do embrião (BUKOWSKA et al., 2013).

Apesar dos diversos estudos a respeito do tema a identificação dos fatores epigenéticos paternos que podem afetar a expressão de genes durante a embriogênese exige maior investigação (DADOUNE, 2009).

#### **1.4. Bases fisiológicas para sexagem espermática**

##### **1.4.1. Diferenças no conteúdo de DNA**

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e, até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozoides X ou Y *in vitro* (JOHNSON; WELCH, 1999). Essa diferença varia de 3,70 a 4,44% nos touros (SHARPE; EVANS, 2009), mas também foi descrita

em outras espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON et al., 1994) como nos coelhos (3%), nos porcos (3,6%), nos cavalos (3,7%), nos carneiros (4,2%) e nos cães (3,9%) (JOHNSON; WELCH, 1999). Com base nesta diferença, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a seleção do sexo dos espermatozoides: a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade.

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo mostra-se pouco eficiente em relação ao investimento com o equipamento (U\$ 250,000) e a baixa produção/equipamento/hora, que gira em torno de 6.000 espermatozoides por segundo, em alta velocidade de separação restringindo sua utilização na indústria da inseminação artificial (JOHNSON; WELCH, 1999; GARNER, 2006, GARNER; SEIDEL, 2008; SHARPE; EVANS, 2009). Ademais, outros fatores limitantes podem ser destacados, como o baixo número de espermatozoides sexados viáveis; a longa exposição ao corante sob alta temperatura (37°C); diminuição nos parâmetros de fertilidade *in vitro* (produção *in vitro* de embriões) (BEYHAN et al., 1999), e a utilização de sêmen congelado. O processo de congelação prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos com o corante Hoechst 33342 diminuindo eficiência da sexagem de espermatozoides descongelados (JOHNSON et al., 1994). O Hoechst 33342 é um corante de núcleo celular que emite uma fluorescência azul com diversas funções incluindo uma detecção sensível ao DNA e dessa forma muito utilizado na separação de células espermáticas (INVITROGEN, 2005).

Isto restringe a utilização de sêmen de alta qualidade e de touros provados, dentro de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a produção *in vitro* de embriões (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007).

A separação dos espermatozoides contendo o cromossomo X ou Y pela citometria de fluxo utiliza uma sonda fluorescente com especificidade para o DNA e a separação ocorre de acordo com a intensidade da fluorescência mensurada pelo equipamento (JOHNSON; WELCH, 1999). A sonda fluorescente (Hoechst 33342) penetra na célula espermática íntegra e se liga ao DNA e as amostras são inseridas no aparelho de citometria. Um cristal vibrador, presente no citômetro, quebra o fluxo formando cerca de 70.000 a 80.000 gotas por segundo. Geralmente, cada terço de gota contém um espermatozoide e nos outros dois

terços restantes não há células. Como o espermatozoide X possui uma maior porcentagem de DNA a intensidade de fluorescência é maior em relação ao Y e quando as células com o X são excitadas pelo laser, emitem uma maior intensidade de fluorescência. Essa diferença é detectada pelos filtros fotomultiplicadores e analisada pelo computador. Os espermatozoides portadores do cromossomo X recebem uma carga positiva; os portadores do cromossomo Y recebem uma carga negativa, os indistinguíveis ou danificados não recebem nenhuma carga. A gotícula contendo as células espermáticas passa por um campo elétrico e os espermatozoides são atraídos atravessando a câmara de fluxo contendo um bico de forma achatada o qual orienta a célula espermática. Os espermatozoides X, com carga positiva, são atraídos pelo campo negativo, e os Y, com carga negativa, são atraídos pelo positivo, os que não possuem carga prosseguem sem serem atraídos. Dessa forma, são produzidos três fluxos que são recolhidos por tubos coletores (JOHNSON, 1992; SEIDEL, 2007).

Apesar dos tratamentos utilizados no método de citometria de fluxo (coloração com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta) aparentemente não impedirem o desenvolvimento *in vitro* do zigoto, Libbus et al. (1987) observaram aberrações cromossômicas em 50% das células de *Microtus oregoni* (uma espécie de roedor), após a sexagem por esse método. Além disso, a licença para a utilização da sexagem por citometria de fluxo é detida por poucas empresas que controlam e restringem sua utilização comercial ou científica a poucos países e grupos de pesquisadores que visam a sexagem de espermatozoides humanos, bovinos e outras espécies de interesse zootécnico.

A centrifugação em gradiente de densidade é considerada uma metodologia simples (TURKER; JANSER, 2002). O processo se baseia na diferença de densidade entre os espermatozoides X e Y, uma vez que os espermatozoides X possuem mais DNA que os espermatozoides Y (SUMNER; ROBINSON, 1976). Em um trabalho foram testados 13 diferentes gradientes de densidade, o sêmen foi depositado sobre os gradientes em um tubo que foi centrifugado em velocidade e tempo determinado segundo o protocolo. Após a centrifugação os espermatozoides foram separados em duas frações, o sobrenadante foi descartado e o sedimento das duas frações foi aspirado nos gradientes de oito e 12 camadas. Os espermatozoides recuperados foram 25% e 75% de Y e X, respectivamente (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2011).

Em um trabalho a diferença entre o uso dos gradientes de albumina, PureSperm e albumina conjugada com PureSperm para separação dos espermatozoides X e Y não apresentaram resultados significativos (ESMAEILPOUR et al., 2012). O uso de um gradiente de densidade de sacarose também mostrou resultados sem diferenças estatísticas para a separação do sexo, entretanto os autores afirmam que esse gradiente é uma ótima ferramenta e de baixo custo para esse fim, porém mais estudos são necessários (KANESHARATNAM et al., 2012).

#### 1.4.2. Diferenças baseadas nas proteínas de membrana

O antígeno de membrana H-Y foi descrito pela primeira vez em 1955 por Eichwald e Silmser, que verificaram que ao transplantar pele de rato macho para uma fêmea esta o rejeitava, entretanto quando o procedimento foi realizado ao contrário fêmea/macho a rejeição não era observada. Ohno, em 1967, mostrou que há uma grande proporção de genes de mamíferos ligados ao cromossomo X que são altamente conservados evolutivamente. Um gene ligado ao cromossomo X encontrado em uma espécie tem um homólogo visto em todas as outras. Esta proposição é conhecida como a Lei de Ohno's.

Pesquisas realizadas com eletroforese de proteínas de membranas de espermatozoides sexados X e Y concluíram que não existem diferenças no perfil proteico das células espermáticas (HENDRIKSEN et al., 1996), porém, os trabalhos que utilizaram a produção de anticorpos para determinação de proteínas de membrana sexo-específicas obtiveram resultados conclusivos, que embasam a continuação das pesquisas neste sentido.

Eletroforese é a separação de moléculas com carga a partir de um campo elétrico. A eletroforese bidimensional consiste em duas fases (dimensões) baseadas nas diferentes propriedades proteicas. Na primeira dimensão, focalização isoeletrica, as proteínas são separadas pela sua carga elétrica, elas migram no gel até uma posição estacionária onde sua carga líquida é zero. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular. Dessa forma há possibilidade de visualização de centenas de proteínas diferentes ao mesmo tempo através de pontos denominados *spots* (SILVA, et al., 2007)

Ohno, não identificou diferenças entre as proteínas de membrana dos espermatozoides portadores do cromossomo X e Y, separados por citometria de fluxo, devido à existência de vários mecanismos de prevenção da expressão haploide (OHNO, 1982), e provavelmente pela troca de mRNA entre espermátides X e Y por pontes citoplasmáticas (HENDRIKSEN et al., 1999). Apesar disso, Bradley (1989) relatou em estudos imuno-histoquímicos um antígeno macho específico sorologicamente detectável presente em cerca de 50% dos espermatozoides na região pós acrossomal da cabeça e da peça intermediária.

A separação das células espermáticas portadoras do cromossomo X e Y foi sugerida por Peter et al. (1993) utilizando anticorpos monoclonais associados a esferas de polímeros magnetizados (separação magnética). Nesta técnica, os espermatozoides foram tratados com anticorpos anti-X ou anti-Y aderidos as esferas magnéticas e submetidos a um campo magnético. A seguir, o sobrenadante foi removido e continha as células do sexo oposto. A acuidade foi testada e foi de cerca de 98%. Posteriormente, a técnica foi depositada em forma de patente por Benjamin et al. (US 6,153,373, 28/11/2000), porém sem a comprovação *in vivo* da eficiência da técnica para separação do sexo desejado. Foi purificada uma proteína de espermatozoide bovino com peso molecular de 19 kDa macho específica por cromatografia de gel de filtração. Um anticorpo monoclonal desenvolvido contra essa proteína discriminou duas populações reveladas por imunofluorescência, microscopia e citometria de fluxo. O anticorpo foi reconhecido em 49,7% da população de espermatozoides (SOUZA, 1999).

Zavos et al. (US 4,999,283, 12/03/1991) depositaram uma patente para o uso do antígeno H-Y na tentativa da separação dos espermatozoides por sexo. Um anticorpo aderente ao antígeno H-Y foi adicionado ao ejaculado não sexado, um segundo anticorpo ligado a um substrato que se liga ao primeiro anticorpo também foi adicionado. A recuperação dos espermatozoides X foi por drenagem da solução, seguida da centrifugação e recuperação das células contendo o cromossomo X no sedimento. Os espermatozoides Y foram recuperados no conjugado antígeno-anticorpo. Spaulding (US 5,660,997, 26/08/1997) depositou a patente que buscou um antígeno sexo específico na membrana plasmática de espermatozoides já previamente sexados. Este antígeno ao se ligar as células espermáticas de determinado sexo inativava sua motilidade impedindo a fertilização.

Em uma patente registrada por Blecher (US 5,840,504; 24/11/1998) sobre a identificação de moléculas sexo específicas cujos resultados foram relatados no seu trabalho de 1999, foi descrito o desenvolvimento de um método para a sexagem imunológica dos espermatozoides, pela identificação de proteínas específicas relacionadas aos cromossomos X e Y (SSP, Sex Specific Protein). O método se baseou na identificação, isolamento e purificação das proteínas e na obtenção de anticorpos anti-proteínas específicas ligadas ao cromossomo X ou Y. Os espermatozoides foram incubados com anticorpos anti-proteína ligada ao cromossomo X e ocorreu uma aglutinação de 50% das células. As células não aglutinadas produziram 92% de embriões do sexo masculino *in vitro*. Neste trabalho não há relatos a respeito sobre a incubação dos espermatozoides com anticorpos anti-proteína ligada ao cromossomo Y. Os autores afirmaram a presença de proteínas relacionadas ao sexo nos espermatozoides X e Y originárias do processo de transcrição e tradução pós-meiótica, as quais são capazes de atravessar as pontes intercelulares durante a espermatogênese, inibindo a troca entre células portadoras dos cromossomo X e Y.

Em um trabalho desenvolvido por Van Tilburg et al. (2006) proteínas espermáticas e do plasma seminal de ovinos foram submetidos à cromatografia de gel filtração e de fase reversa. Picos com tempo de retenção distintos foram encontrados e submetidos à eletroforese, três picos com proteínas de massa molecular em torno de 25 kDa foram identificados. Em seguida foram inoculadas em roedores fêmea. O soro destes animais após ser coletado foi testado em tecido de ovino macho e fêmea a fim de testar a sexo-especificidade. Somente a proteína com tempo de retenção de 39,1 segundos reagiu contra uma proteína originária do tecido ovino macho.

Em 2011, Sang et al. encontraram uma proteína sexo-específica em bovinos com cerca de 30 kDa presente na superfície do espermatozoide X com potencial para ser usada no processo de sexagem imunológica. Proteínas diferenciais expressas entre os espermatozoides X e Y foram comparados pela eletroforese bidimensional. Cerca de 633 e 647 *spots* foram detectados no espermatozoide X e Y respectivamente, destes, 42 foram *spots* diferenciais entre os géis, 16 deles foram identificados por espectrometria de massa e estão intimamente ligados ao metabolismo energético, resistência ao estresse, estrutura

do citoesqueleto e atividade de protease. Os resultados preliminares mostraram uma revisão da expressão diferencial nos níveis de proteína total entre os espermatozoides X e Y. A identificação destas proteínas pode fornecer uma base teórica para a compreensão das diferenças biológicas entre os dois tipos de espermatozoides (CHEN et al, 2012).

Em uma análise eletroforética de membrana em células espermáticas de ovinos tropicalmente adaptados, foram identificados 68 *spots*, dentre estas 37 proteínas diferenciais, o que corresponde a 71,6% da intensidade dos *spots* dos géis, algumas proteínas estavam presentes em múltiplas isoformas. Baseado na ontologia gênica as proteínas foram agrupadas de acordo com os processos biológicos, funções moleculares e localização celular. Os processos biológicos mais comuns associados as proteínas foram processos celulares (34%), resposta a estímulos (14%) e processos metabólicos (11%). Das funções moleculares a ligação (37%) e atividade catalítica (32%) corresponderam as funções moleculares mais comuns. No que se refere à localização celular 22% estava associado às mitocôndrias, 17% ao citoesqueleto e 17% foram definidas como extracelular (VAN TILBURG et al., 2013).

Uma análise proteômica mostrou diferenças significativas entre os cromossomos X e Y de células espermáticas de bovinos, principalmente as relacionadas com a expressão de proteínas que envolvem a organização do citoesqueleto, sugerindo a possibilidade de X e Y serem diferentes em características estruturais como a disposição da cauda do espermatozoide. Este trabalho também sugeriu que as células portadoras do cromossomo X produzem maiores níveis de enzimas glicolíticas que são essenciais para motilidade levando os estudos a se basear na diferença dos sexos baseada no consumo diferencial energético associado ao movimento dos espermatozoides (CANIO et al., 2013).

No que se refere à utilização prática da seleção do sexo por métodos imunológicos permanece a limitação e há necessidade de mais investigações, utilizando técnicas de identificação de proteínas mais sensíveis, a fim de se produzir de um anticorpo específico do espermatozoide X ou Y. referencia

## 1.5. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SEXADO

O processo de criopreservação tem como finalidade suspender o

metabolismo mantendo as características espermáticas por mais tempo (SCHENK et al., 1999), porém células sexadas congeladas tendem a perder a viabilidade com maior rapidez que as células não sexadas, uma vez que o processo de sexagem diminui a viabilidade espermática o que é reforçado pelo processo de congelamento (GARNER, 2006). O uso do sêmen sexado congelado na inseminação artificial tem limitações uma vez que a viabilidade dos espermatozoides é baixa no trato reprodutivo da fêmea, exigindo a deposição do espermatozoide em uma região profundano fundo do útero e próximo ao momento da ovulação. No entanto, as células sexadas criopreservadas não tem sua capacidade de fertilização *in vitro* reduzida (MAXWELL et al., 2004). Hollinshead et al. publicaram em 2004 o primeiro relato de produção de descendentes de um sexo pré-determinado congelado utilizado em FIV. Os pesquisadores concluíram que os espermatozoides foram totalmente funcionais, apesar do processo de congelação e sexagem.

O processo de criopreservação promove danos não só a motilidade espermática como também a integridade do DNA afetando algumas regiões do genoma. Este fato é relevante, pois vários estudos tem demonstrado a importância dos genes paternos para o desenvolvimento embrionário inicial (VALCARCE et al., 2013).

Apesar da sexagem de espermatozoides estar a alguns anos no mercado, ainda demanda estudo e aperfeiçoamento. A citometria de fluxo tem 90% de acuidade, porém, causa danos irreparáveis as células espermáticas e as suas proteínas de membrana.

## REFERÊNCIAS

BAKER, M.A.; NIXON, B.; NAUMOVSKI, B.; AITKEN, R.J. Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, p. 211-217, 2012.

BARROS, M.D. CURCIO, D.F. Genética: o pão nosso de cada dia. **O anatomista**, v. 1, p. 9-14, 2012.

BARTH, A. D. & OKO, J. R. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**,

Iowa, Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BELLOTT, D.W.; PAGE, D.C. Reconstructing the Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 74, p. 345-353, 2009.

BEYHAN, Z.; JOHNSON, L.A.; FIRST, N.L. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high-speed flow cytometry. **Theriogenology**, v.52, p.1115-6, 1999.

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

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, p. 147-155, 2007.

BONDAN, J. A. **Sêmen sexado, finalmente é uma realidade?** Disponível em: <<http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=60&IDC=1&PHPSESSID=8b33be216ebb66096488ec39a6ba5014>> Acesso em 27 mar. 2012.

BRADLEY, M.P. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.3372-80, 1989.

BUKOWSKA D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; SOSINSKA, P.; WOZNA, M.; CIESIOLKA, S.; ANTOSIK, P.; JASKOWSKI, J.M.; BRÜSSOW, K.P.; NOWICKI, M. The structure and role of mammalian sperm RNA: a review. **Veterinary Medicine**, v. 58, p. 57-64, 2013.

CANIO, M.; SOGGIU, A.; PIRAS, C.; BONIZZI, L.; GALLI, A.; URBANICD, A.; RONCADA, P. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, 2013.

CARVALHO, E.C.; PRESTES, M.E.B. Lazzaro Spallanzani e a geração espontânea: os experimentos e a controvérsia. **Revista da Biologia**, v. 9, p. 1-6, 2012.

CHEN, X.; ZHU, H.; WU, C.; HAN, W.; HAO, H.; ZHAO, X.; DU, W.; QIN, T.; LIU, Y.; WANG, D. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 59.67, 2012.

Cytogam, Inc. **Methods for determining antibodies specific for sex associated sperm membrane proteins**. SPAULDING, G. F.; ARIZ, C. US 5,660,997, 26/08/1997.

DADOUNE, J. Spermatozoal RNAs: What about Their Functions? **Microscopy Research and Technique**, v. 72, p. 536-551, 2009.

DE JARNETTE, M. **Sêmen sexado: uma realidade**. Disponível em: <<http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=94&IDC=3&PHPSESSID=7779520d1346c3e53f0e3cb2030804a8>> Acesso em 06 mar. 2012.

EDDY, E.M. Regulation of gene expression during spermatogenesis. **Cell and Development. Biology**, v.9, p.451-7, 1998.

EICHWALD, E.J.; SILMSER, C.R. Untitled communication. **Transplant Bull**, p.148-49, 1955.

ESMAEILPOUR, T.; ELYASI, L.; BAHMANPOUR, S.; GHANNADI, A.; MONABBATI, A.; DEHGhani, F.; KAZEROONI, M. Effect of combined density gradient centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 10, p. 435-440, 2012.

FEUGANG, J.M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G.C.; TOPPER, E.K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v.21, p. 312– 324, 2010.

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.; GLEDHILL, B.L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M.A.; JOHNSON, L.A. Quantification of the X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry. **Biology of Reproduction**, v.28, p. 312-321,1983.

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

HENDRIKSEN, P.J.; WELCH, G.R.; GROOTEGOED, J.A., et al. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X – and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. **Molecular Reproductive Development**, v.45, p.342-50, 1996.

HOLLINSHEAD, F.K., EVANS, G., EVANS, K.M., CATT, S.L., MAXWELL, W.M. C., O'BRIEN, J.K. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen–thawed sex-sorted and re-frozen–thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p.557–568, 2004.

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

HOSSEPIAN DE 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**, v.36, p.219-228, 2007.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M., 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, p. 480, 2000.

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

IBGE, PPM 2010: **Rebanho bovino nacional cresce 2,1% e chega a 209,5 milhões de cabeças.** Disponível em:<[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2002&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1)>. Acesso em: 06 mar. 2012.

INVITROGEN. Hoechst stains. **Molecular Probes**, 2005.

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

JOHNSON, L.A.; 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.; 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, p.51-6, 1994.

KANESHARATNAM, N.; ESWARAMOHAN, T.; BALASUBRAMANIAM, K. A. Preliminary Study for Sperm Sexing by Using Sucrose Density Gradients in Jersey Bull at Artificial Insemination Centre at Thirunelvely (Northern Province of Sri Lanka). **International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics** v. 31, p. 37-40, 2012.

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

LAGOA DA SERRA, **Sansão** Disponível em: <http://www.crvlagoa.com.br/animais.asp?idR=35&idA=1187#.UUNGWzfzMSk>. Acesso em: 15 mar. 2013.

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.

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. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE 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.

MEDALHA, A. G. **Sêmen Sexado**. 2008. 23 f. Dissertação (Seminário I do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

MILKPOINT, **ASBIA comemora forte crescimento em 2011**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/asbia-comemora-forte-crescimento-em-2011-77880n.aspx>> Acesso em: 08 mar. 2012.

MILLER, D.; OSTERMEIER, G. C. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, p. 840-846, 2006.

MILLER, D.; OSTERMEIER, G. C.; KRAWETZ, S. A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. **Molecular Medicine**, v. 11, p. 156-163, 2005.

MOREIRA-FILHO, C.A.; RAMALHO, M.D.T.; KIRNZENBAUM, M.; COTINOT, C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, p. 483, 2000.

MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 319-323, 1979.

OHNO, S. Expression of X and Y linked genes during mammalian spermatogenesis. **Prospects for sexing mammalian sperm**, p.109-13, 1982.

OSTERMEIER, G.C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J.D.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, v. 429, p. 154, 2004.

PACE, M.M. Implications of Sexed Semen on the Beef Industry. In: **39TH ANNUAL FLORIDA BEEF CATTLE SHORT COURSE PROCEEDINGS**, 1990, Gainesville. Anais... Gainesville: University of Florida, 1990. 238p.

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.

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

RAMALHO, M.D.T.; ALVES, B.C.A.; MOREIRA-FILHO, C.A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sexing of murine and bovine embryos by development arrest induced by high titer H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, p. 484, 2000.

ROOSEN-RUNGE, E. C. **The process of spermatogenesis in animals**. London, Cambridge University Press, 1977. p.1-12.

RORIE, R.W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenology**, v.52, p.1273-80, 1999.

RUVUNA, F.; TAYLOR, J.F.; WALTER, J.P.; TURNER, J.W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **Journal of Animal. Science**, v. 70, p. 1091-97, 1992.

SANG, L.; 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 Dairy Science**, v. 94, p. 2060–2070, 2011.

SCHENK, J.L. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375-1 391, 1999.

SEIDEL JR., G.E.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 124, p. 733-743, 2002.

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

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

SEIDEL JR., G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1267-72, 1999.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Current Conceptions: Pullman, WA, 2. ed. 2003. 373p

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

SILVA, A.M.S.;CORRÊA, G.C.; REIS, E.M. Proteomica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.2, p. 1-10, 2007.

SOUZA, C.J.P.; MATTA, M.F.R.; CRUZ, G.M.; ALVES, E.W.; KANASHIRO, M.M.; SILVA, J.F.S. Anticorpo Monoclonal Contra uma Proteína Macho-Específica de 19 kDa em Espermatozoides Bovinos: uma Metodologia Promissora para Imunosexagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p.74-78, 1999.

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, p. 9-15, 1976.

TAYLOR, C.S.; MOORE, A.J.; THIESSEN, R.B.; BAILEY, C.M. Food efficiency in traditional and sex controlled systems of beef production. **Animal Production**, v.40, p.401-440, 1985.

TUCKER, K.; JANSEN, C.A.M. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. In: Proceedings 2nd International workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART lab, 2002.

University of Guelph - **Method for separating sex specific molecules and non-sex specific molecules**. BLECHER, S. R. Guelph, Canada. US 5,840,504; 24/11/1998.

University of Kentucky Research Foundation - **Method for x and y spermatozoa separation**. ZAVOS, P.M; DAWSON, K.A. Lexington, KY. US 4,999,283, 12/03/1991

Vicam, L.P., - **Method for sex determination of mammalian offspring**. BENJAMIN, T.L.; KOHN, B.; BASKER, C. J.; GEORGE, S.; LIVINGSTON, D. WatertoWn, Mass. US 6,153,373, 28/11/2000

VALCARCE, D.G.; CARTÓN-GARCÍA, F.; RIESCO, M.F; HERRÁEZ, M.P.; ROBLES, V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. **Andrology**, v. 1, p. 723-730, 2013.

VAN TILBURG, M.F.; MACHADO, O.L.T.; SILVA, J.F.S.; MATTA, C.G.F.; FAGUNDES, B.; MATTA, M. F. R. Identificação de antígeno macho-específico de ovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p.231-233, 2006.

VAN TILBURG, M.F.; RODRIGUES, M.A.M.; MOREIRA, R.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CÂNDIDO, M.J.D.; MOURA, A.A. Membrane-

associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, p. 1247-1261, 2013.

VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E.; BRANDFORD OLTENACU, E.A. **Genetics for the animal science**. New York: W.H. Freeman, cap.13, p.287-313, 1987.

# Capítulo 2

## **1. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **1.1. Hipótese**

A citometria de fluxo utilizada para sexagem espermática altera a quantidade e o padrão das proteínas de membrana dos espermatozoides bovinos.

### **1.2. Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do processo de citometria de fluxo para sexagem espermática sobre as proteínas da membrana de espermatozoides bovinos.

### **2.3. Objetivo específico**

Traçar um perfil eletroforético a fim de encontrar diferenças densitométricas entre as proteínas presentes nos espermatozoides congelados sexados e não sexados

# Capítulo 3

Trabalho elaborado segundo as normas da Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, ISSN 1678-4162, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2012

**EFEITOS DA SEXAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO SOBRE A  
COMPOSIÇÃO PROTEÍCA DA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS**

**EFFECTS OF SEXING BY FLOW CYTOMETRY ON THE COMPOSITION OF  
SPERM BOVINE MEMBRANE PROTEIN**

Scott, C.<sup>A</sup>; Souza, F.F.<sup>A</sup>; Guasti, P.N.<sup>A</sup>; Santos, L.D.<sup>B</sup>; Dell'Aqua Junior, J.A.<sup>A</sup>

<sup>A</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

<sup>B</sup> Pós-graduação em Doenças Tropicais, CEVAP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

E-mail: dellaquajunior@uol.com.br

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 18610-970, Fone: (14) 38802119, Fax: (14) 38802119, Botucatu, São Paulo, Brasil.

**RESUMO**

A citometria de fluxo é o único método comercialmente eficaz na separação de espermatozoides por sexo específico, entretanto, leva a danos irreparáveis as células espermáticas. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar lesões causadas pela citometria de fluxo nas proteínas de membrana do espermatozoide bovino. Foram adquiridas comercialmente doses sexadas para X (15 doses, 3 touros), para Y (15 doses, 3 touros) e convencional (15 doses, 3 touros). As proteínas de membrana foram extraídas com a associação do detergente Nonidet P-40 e sonicação. As amostras de extrato proteico total foram submetidas a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 12% (m/v). Os géis foram fotodocumentados e avaliados quanto a densitometria óptica dos spots diferenciais entre as amostras convencional e sexada. O perfil proteico das amostras de sêmen convencional apresentaram a maior parte das proteínas com massa molecular entre

11 e 15 kDa e pI entre 4,0 e 5,5 as quais foram pouco ou não expressas nas amostras de sêmen sexado. Tais proteínas podem estar relacionadas as BSPs e os danos causados pelo processo de sexagem podem levar baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos a citometria de fluxo.

Palavras-chave: BSPs, célula espermática, citômetro de fluxo, proteína, sêmen-sexado

## **ABSTRACT**

Flow cytometry is the only effective method to sorting sperm, however leads to irreversible protein damage sperm cells. Thus, this study aimed at evaluating injuries caused by flow cytometry in the bovine sperm membrane proteins. Commercially sorted doses X (15 doses, 3 bulls) and Y (15 doses, 3 bulls) and conventional (15 doses, 3 bulls) were acquired . The membrane proteins were extracted using a combination of detergent Nonidet P -40 and sonication. Samples of total extract protein were submitted to two-dimensional electrophoresis with 12% polyacrylamide gel. Gels were photodocumented and evaluated for bone densitometry of the spots differential between conventional and sorted samples. A cluster was found in conventional semen samples with molecular weight between 11 and 15 kDa and pI between 4.0 and 5.5 has been little or not expressed in samples with sexed semen. Such proteins may be related to the BSPs and the damage caused by the sexing process take low fertility of sperm undergoing flow cytometry.

Key-words: BSPs, flow-cytometry, protein-sexed semen, sperm cells

## **Introdução**

Atualmente a única técnica comercialmente considerada viável na separação por sexo é a citometria de fluxo, uma vez que sua eficácia na seleção para o sexo proposto é em torno de 90% (MIR e KUMAR, 2012). Apesar de ser a única técnica aprovada para comercialização, a citometria de fluxo não é eficiente em relação ao investimento com o equipamento e pela baixa produção/equipamento/hora (SHARPE e EVANS, 2009). Além disso, a licença para a utilização da sexagem por citometria de fluxo é detida por poucas empresas que controlam e restringem a sua utilização comercial ou científica a poucos

países e grupos de pesquisadores que visam a sexagem de espermatozoides humanos, bovinos e outras espécies de interesse zootécnico.

Outros fatores limitantes são o baixo número de espermatozoides sexados viáveis, pois a exposição ao corante Hoechst 33342 sob alta temperatura, combinado com o impacto de um feixe de laser ultra violeta (UV) são dois agentes potencialmente mutagênicos além de diminuir a fertilidade (BEYHAN et al., 1999; PARRILLA et al., 2004). Espermatozoides corados com Hoechst 33342 com ou sem subsequente citometria tem sua capacidade de fertilização afetada e podem produzir deformidades congênitas na prole (MORRELL e DRESSER, 1989). Libbus et al. (1987) observaram aberrações cromossômicas em 50% dos espermatozoides de *Microtus oregoni* (espécie de roedor), após a sexagem pela citometria de fluxo. Um estudo recente em bovinos demonstra que os espermatozoides sexados criopreservados são capazes de fertilizar oócitos, porém a taxa de fertilização é menor e há uma maior perda embrionária precoce (UNDERWOODA et al., 2010).

Espermatozoides de ovinos foram incubados com Hoechst 33342 e submetidos a citometria de fluxo. Os espermatozoides sexados e os não sexados foram utilizados. As proteínas de membrana foram extraídas e caracterizadas por eletroforese uni e bidimensional. Os resultados da eletroforese unidimensional demonstraram pela análise densitométrica que a proporção proteica nas amostras com sêmen convencional foram maiores comparadas as amostras com sêmen sexado (LEAHY, 2011).

A alta pressão exercida pelo citômetro de fluxo durante o processo de sexagem também é um fator interferente na qualidade do espermatozoide e dessa forma foi postulado por alguns pesquisadores que a redução da pressão poderia diminuir os danos causados as células espermáticas sem prejudicar o desempenho do equipamento (SUH et al., 2005). Um outro limitante da citometria de fluxo é o processo de criopreservação que causa alterações em algumas proteínas que influenciam o metabolismo e assim consequentemente as características fertilizantes do ejaculado (RONCOLLETA et al., 2006). Ainda que a criopreservação permita o armazenamento a longo prazo de material biológico sem que haja deterioração da qualidade não existem informações a respeito dos danos sutis como a nível de DNA, mRNA e função proteica (LIN e TSAI, 2012).

A citometria de fluxo é a única técnica atualmente passível de comercialização. Entretanto, o processo de sexagem causa vários danos nas proteínas das células espermáticas o que pode levar a problemas relacionados a fertilidade e a formação do zigoto. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da sexagem

espermática por citometria de fluxo sobre as proteínas da membrana de espermatozoides bovinos.

## **Material e Métodos**

### **1. Aquisição das doses**

Foram utilizadas amostras de sêmen congelado sexado por citometria de fluxo (30 palhetas francesas de 0,25 mL, sendo 15 palhetas de espermatozoides sexados X e 15 sexado Y) e não sexado (15 palhetas francesas de 0,25 mL) de 3 touros adquiridas de uma Central de Inseminação Artificial.

### **2. Extração das proteínas de membrana espermática e preparação das amostras para eletroforese bidimensional**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, durante 40 segundos, e o conteúdo transferido para um tubo plástico. A seguir, o conteúdo foi diluído na proporção de 1: 2 em tampão contendo inibidores de proteases (TIP – 0,8 mmol EDTA, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina e 35 µg/mL PMSF [Phenylmethylsulfonyl Fluoride] em 50 mmol TRIS – HCl pH 7,2), segundo recomendado por Bollag et al. (1996). As amostras foram centrifugadas a 700xg, à 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e uma nova solução de TIP, em um volume de 1 mL, foi adicionada ao sedimento, que foi ressuspendido e novamente centrifugado. Esse mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e nova solução de TIP no mesmo volume foi adicionada aos espermatozoides (RONCOLLETA, 1999). Uma concentração de 0,1% de Nonidet P-40 (GE HealthCare, Uppsala, Suécia) foi adicionada a cada amostra (RAJEEV e REDDY, 2004). Ato contínuo, as amostras foram sonicadas segundo Baker et al. (2002), com uma probe de 3,0 mm, numa amplitude de 20%, durante 30 segundos repetidas por 10 vezes, com intervalos de um minuto entre as séries em banho de gelo.

Após a sonicação, as amostras foram agitadas de forma contínua em agitador de tubos, durante 3 minutos, e centrifugadas a 15.000xg, à 4°C, durante 30 minutos (BAKER et al., 2002). O sobrenadante (extrato de proteínas de membrana) foi retirado e armazenado a -20°C.

## 2. Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA, BOLLAG et al., 1996). Posteriormente, as amostras foram separadas em tubos contendo 200 µg de proteína, liofilizadas (Liofilizador E2M8, Edwards, Irvine, USA) e congeladas a -20°C até o momento do uso.

## 3. Eletroforese bidimensional

As amostras liofilizadas, contendo 200 µg de proteína total foram descongeladas e diluídas com tampão de rehidratação (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e solução contendo anfólitos (IPG Buffer, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). As amostras foram depositadas em uma bandeja de rehidratação e fitas contendo o gel gradiente de pH (Immobiline DryStrip pH 3-10, 7 cm 3 a 10 NL, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foram acomodadas sobre as amostras. O conjunto foi coberto por óleo mineral e permaneceu por cerca de 16 a 18 horas, a temperatura ambiente para rehidratação passiva.

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada em equipamento específico (Protean IEF Cell, Bio Rad, Berkeley, Estados Unidos) o qual foi programado com 250 V por 15 minutos, 4.000 V por 2 horas, 4.000 V até 20.000 e 500 V até a retirada das amostras. Após a IEF, a segunda dimensão (SDS-PAGE) foi realizada numa mini-cuba vertical (Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System GE Healthcare, Uppsala, Suécia), utilizando-se um gel separador de 12% (m/v) de poliacrilamida. Para tal, as fitas foram equilibradas na solução de equilíbrio I (6 M de uréia, 2% [m/v] de SDS, 0,375 M de TRIS HCl pH 8,8, 20% [v/v] de glicerol e 130 mM de DTT) durante 20 minutos, sob constante agitação e na solução de equilíbrio II (6 M de uréia, 2% [m/v] de SDS, 0,375 M de TRIS HCl pH 8,8, 20% [v/v] de glicerol e 135 mM de iodoacetamida), pelo mesmo período. As fitas foram acomodadas sobre o gel separador após lavagem em tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% [m/v] em água ultrapura); um padrão de massa molecular (Full Range Rainbow, Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 10 a 250 kDa, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foi adicionado lateralmente a cada fita, e recobertos com agarose 0,5% (m/v) (0,5% agarose, 0,001% em tampão de corrida). A corrida foi realizada com 15 mA por gel e voltagem máxima de 180

Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie brilhante azul 0,025% (1,0 g

de coomassie azul brilhante R-250, 450 mL de metanol, 100 mL de água ultrapura e 450 mL de ácido acético glacial) e descoradas em uma solução contendo 20% de metanol, 20% de ácido acético glacial e água ultrapura. As imagens foram digitalizadas, utilizando-se um equipamento fotográfico de 14 megapixels (modelo  $\alpha$ 290, Sony Corporation, San Diego, CA, USA). As imagens foram avaliadas pelo programa PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad, Berkeley, USA) para determinar a massa molecular, ponto isoelétrico e densitometria dos *spots* encontrados.

### Análise Estatística

Para a comparação dos resultados da concentração de proteína total nas amostras de extrato de membrana do sêmen convencional, sexado X e sexado Y foi utilizado o método de Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado foi de 5%. Para as análises foi utilizado o software SigmaPlot for Windows, version 11.0, 2008.

### Resultados

As concentrações do extrato proteico total foram calculadas considerando o mesmo número de células espermáticas para as amostras estudadas demonstraram maior concentração de proteína total no sêmen sexado ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao convencional, no entanto não houve diferença entre as amostras X e Y (Tab. 1).

Tabela 1: Mediana (máximo e mínimo) da concentração de proteínas totais no extrato de membrana, das amostras de sêmen convencional, sexado X e sexado Y

Amostra	Mediana	Mínimo	Máximo
Convencional	0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
X	0,66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Y	0,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Na análise eletroforética foram encontrados no total 109 *spots* (Tab. 2), sendo 68 nas amostras de sêmen convencional, 58 nas sexadas X, 73 nas Y, e 25 comum as três amostras (Fig. 1). Cerca de 17 *spots* estavam presentes apenas nas amostras de sêmen convencional e ausentes nas amostras sexadas, sendo que destes, 10 *spots* apresentaram massa molecular entre 11 e 15 kDa, 14 *spots* são comuns somente as amostras sexado X e sexado Y (Fig. 2).

Tabela 2: Massa molecular, ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica dos extratos de membrana espermática das amostras de sêmen convencional, sexado X e sexado Y.

Nº	Massa molecular	pI	Continuação		
			Convencional	Sexado X	Sexado Y
1	106,7	8,6	1.225,7	-	1.038,1
2	106,7	8,5	400,4	-	772,9
3	106,4	8,8	910,2	-	2.569,5
4	106,1	8,9	1.025,9	-	5.098,5
5	104,9	9,0	345,4	-	2.248,6
6	80,1	9,5	15.350,5	-	637,2
7	69,4	9,5	4.743,1	-	1.773,1
8	60,7	5,6	14.394,3	52.493,8	-
9	60,4	4,9	14.039,9	54.403,2	-
10	60,3	5,4	13.470,3	53.393,9	-
11	59,9	5,1	14.031,6	249.655,4	-
12	56,3	8,2	249,9	2.475,2	-
13	56,1	8,4	711,5	3.652,8	-
14	55,8	8,6	97,9	5.248,7	5.129,6
15	55,5	8,8	-	3.205,6	3.335,3
16	54,8	6,6	16.761,6	69,3	-
17	54,5	6,1	15.769,4	-	-
18	54,5	9,0	-	-	3.037,1
19	54,5	6,5	14.885,9	385,1	-
20	54,2	5,8	16.656,0	-	-
21	53,7	6,8	2.058,0	81,8	-
22	52,2	8,3	627,4	14.436,3	12.054,3
23	52,1	8,0	-	7.161,7	13.319,5
24	51,8	8,2	8.840,6	-	11.431,0
25	51,1	7,8	-	-	12.139,2
26	50,9	8,5	16.820,6	18.391,1	16.306,7
27	50,6	6,3	-	-	1975,6
28	50,2	8,8	17.006,9	33.796,5	20.087,1
29	50,0	9,0	14.059,9	10.396,5	25.369,1
30	49,8	9,2	4.496,9	27.018,2	24.345,3
31	49,6	5,1	-	-	3.585,9
32	46,0	9,3	16.700,3	21.830,2	17.874,6
33	45,9	4,9	-	-	2.858,2
34	45,5	8,8	1.040,5	53,1	2.983,0
35	45,5	8,3	1.401,5	169,8	7.623,2

Tabela 2: Massa molecular, ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica dos extratos de membrana espermática das amostras de sêmen convencional, sexado X e sexado Y.

Continuação

Nº	Massa molecular	pI	Convencional	Sexado X	Sexado Y
36	45,1	5,1	3.449,8	-	3.819,2
37	45,1	8,6	2.931,4	256,3	1.090,0
38	45,1	9,0	6.071,9	2.726,0	2.631,4
39	43,4	6,2	-	-	1.476,8
40	42,2	9,8	15.261,4	794,1	-
41	41,2	8,2	15.612,3	12.325,4	12.794,9
42	41,0	8,5	16.532,2	1.906,8	9.775,1
43	41,0	8,5	-	6.837,1	-
44	41,0	7,1	13.274,0	19.911,5	-
45	41,0	8,7	-	331,1	14.278,7
46	40,9	9,1	-	308,6	11.018,2
47	40,8	8,9	-	379,1	7.262,5
48	40,8	6,8	11.786,3	76.217,1	190.748,2
49	40,8	7,6	15.226,7	16.522,5	19.477,8
50	40,2	5,1	-	29.185,0	70.450,2
51	40,2	5,3	-	75.718,3	15.100,9
52	40,0	4,9	2.506,8	-	13.055,7
53	37,7	5,1	4.425,9	-	-
54	35,8	5,2	6.941,3	-	1.056,9
55	35,8	4,1	13.868,5	34.786,5	-
56	35,2	3,9	15.285,9	-	-
57	35,2	5,0	-	-	543,4
58	35,2	5,1	-	-	3.162,2
59	33,0	5,2	-	10.820,1	13.647,5
60	32,6	4,3	3.157,0	-	-
61	32,1	9,0	16.207,2	3.892,1	10.607,0
62	32,0	8,7	-	-	1.032,5
63	32,0	9,6	1.279,3	2.048,7	-
64	31,7	9,1	-	-	12.721,1
65	30,5	9,9	-	898,4	-
66	30,3	5,4	-	-	4.488,5
67	29,4	5,2	-	-	11.174,4
68	29,4	8,9	-	22.186,5	11.680,0
69	29,2	9,5	-	1.368,3	-
70	28,3	9,3	16.492,3	7.089,2	35.892,4

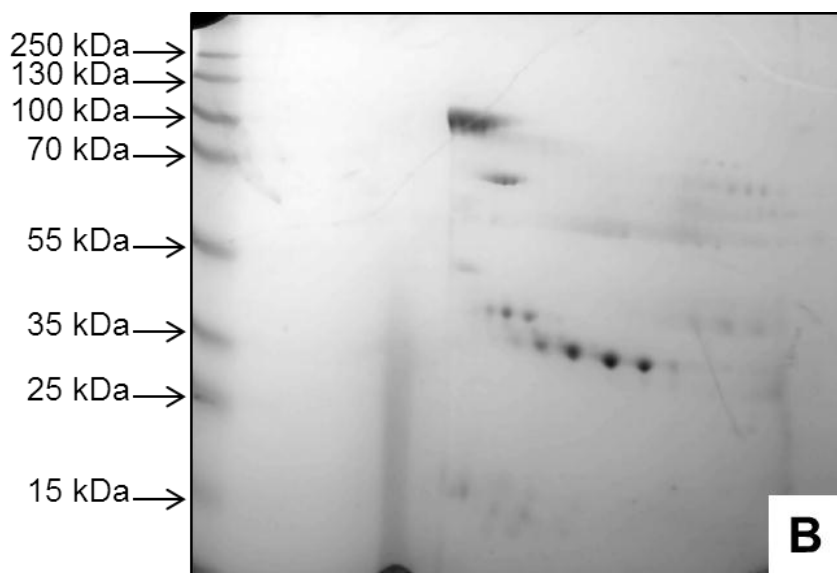
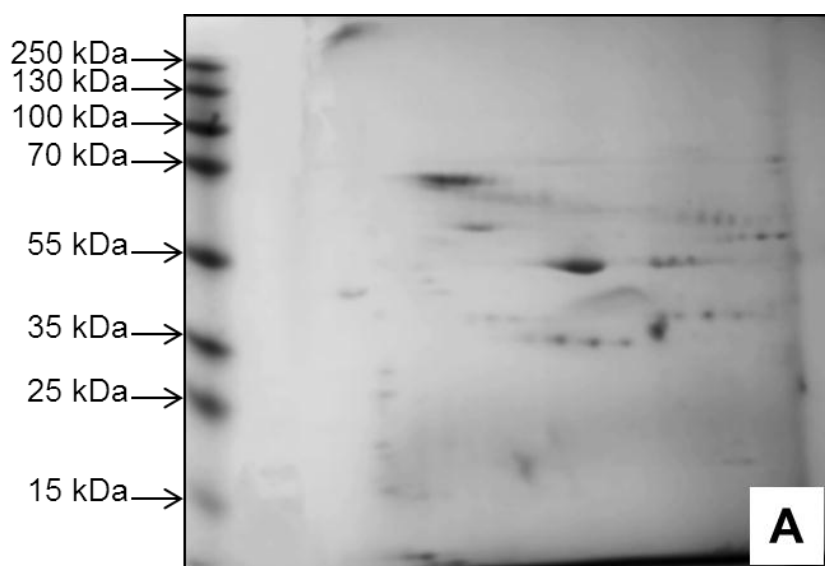
Tabela 2: Massa molecular, ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica dos extratos de membrana espermática das amostras de sêmen convencional, sexado X e sexado Y.

Continuação

Nº	Massa molecular	pI	Convencional	Sexado X	Sexado Y
71	28,3	5,7	4.308,6	21.052,8	18.627,1
72	28,3	6,5	6.977,2	4.795,8	11.299,8
73	28,1	6,0	16.544,9	49.104,9	47.900,5
74	27,9	6,2	14.924,0	45.861,1	36.372,8
75	25,9	4,4	17.017,7	-	-
76	25,5	6,1	-	14.763,9	5.040,7
77	25,5	6,5	16.388,4	60.679,6	44.436,7
78	25,1	6,9	14.597,6	148.625,4	172.107,5
79	25,1	9,4	-	-	4.375,6
80	24,7	7,3	15.074,1	155.086,7	235.187,2
81	24,5	7,8	16.527,7	109.334,7	149.428,7
82	24,4	8,2	-	26.733,6	21.956,7
83	24,1	9,0	-	-	2.794,7
84	22,0	4,4	16.332,7	-	-
85	14,9	5,2	102,2	-	-
86	14,6	4,3	16.789,5	-	-
87	13,9	4,3	16.678,0	-	-
88	13,5	6,0	13.913,4	-	-
89	13,0	4,5	1.138,5	-	-
90	12,7	5,1	171,7	-	-
91	12,6	4,2	6.815,6	-	-
92	12,5	4,6	638,5	-	-
93	12,0	4,4	16.688,3	-	-
94	11,7	4,8	-	405,1	-
95	11,4	4,6	15.160,1	26.728,5	-
96	11,2	9,6	5.305,4	-	2.360,9
97	11,1	9,3	2.111,9	-	-
98	10,9	6,3	-	1.254,9	-
99	10,9	6,9	-	1.101,1	4.137,8
100	10,8	5,5	-	-	25.084,0
101	10,2	6,5	-	-	9.226,5
102	10,0	9,1	-	-	2.234,7
103	9,3	5,2	-	884,5	12.309,0
104	9,0	5,9	-	30,4	5.261,7
105	9,0	5,6	-	-	12.834,7

Tabela 2: Massa molecular, ponto isoelétrico (pI) e densidade óptica dos extratos de membrana espermática das amostras de sêmen convencional, sexado X e sexado Y.

N°	Massa molecular	pI	Conclusão		
			Convencional	Sexado X	Sexado Y
106	8,9	5,4	-	-	30.386,3
107	8,3	5,8	-	-	11.256,7
108	8,1	6,2	-	-	13.361,3
109	7,5	6,8	-	-	3.994,6



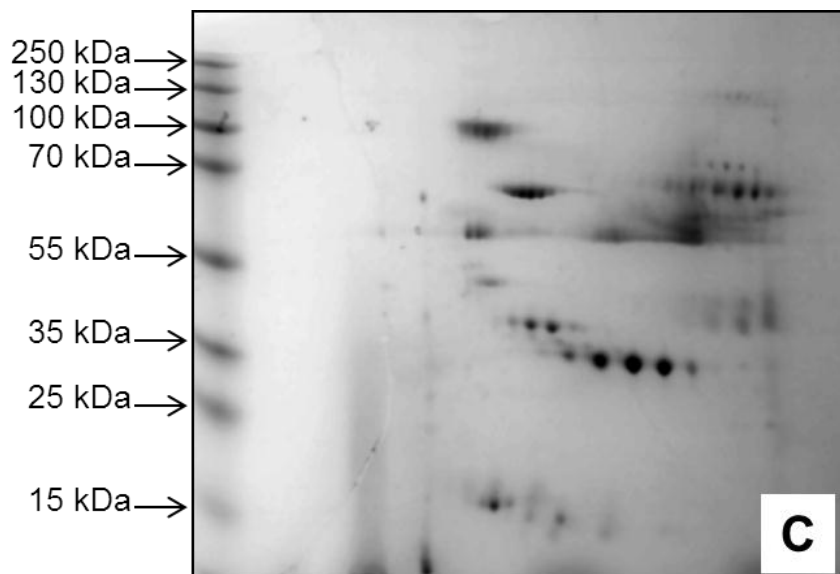


Figura 1: Gel de eletroforese bidimensional corado com Coomassie azul brilhante R-250. A Amostra convencional. B Amostra sexada para X. C Amostra sexada para Y.

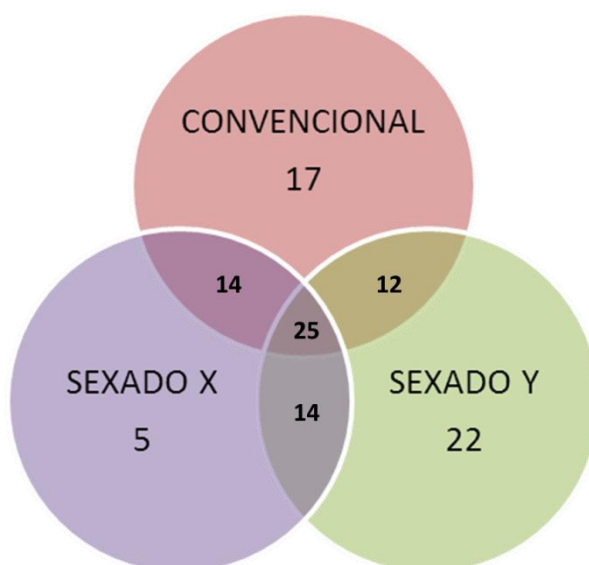


Figura 2: Total de *spots* encontrados em cada amostra individualmente, e *spots* comuns entre as amostras

## Discussão

Neste trabalho o uso do detergente Nonidet P-40 associado a um protocolo de sonicação, promoveu uma satisfatória remoção das proteínas de membrana dos espermatozoides de bovinos, para que pudessem ser melhor estudadas, como descrito por Leahy, (2011) que afirma que essas proteínas orquestram eventos da fertilização, e podem ser removidas ou alteradas por estressores mecânicos e de diluição associado com a

separação por sexo dos espermatozoides.

Embora a concentração espermática tenha sido diferente entre as amostras convencional e sexada ( $30 \times 10^6$  e sexado de  $2,1 \times 10^6$  células respectivamente), devido a diferença na quantidade de células por palheta (CARVALHO et al., 2009), é importante mencionar que os cálculos foram baseados em quantidade de proteína total/ $2,1 \times 10^6$  espermatozoides. Desta forma, pode-se afirmar que as concentrações proteica nas amostras de sêmen convencional e sexado foram diferentes neste trabalho.

O número de *spots* encontrados no sêmen convencional congelado foi inferior (68 *spots*) ao observado por Roncoletta (1999) que encontrou 391 *spots* no sêmen fresco. Recentemente, Byrne et al. (2012) encontraram 419 proteínas nos espermatozoides não-criopreservados de touros adultos, sendo que 67% foram associadas a membrana, entre estas 118 foram identificadas como proteínas transmembrana. Tal diferença está relacionada ao processo de criopreservação, que deprime a quantidade de proteínas da membrana espermática (OLLERO et al., 1997; DHANJU et al., 2001, SANCHO et al.; 2007), contudo os efeitos destas alterações na função espermática são desconhecidos (LEAHY e GADELLA, 2011).

O sêmen sexado é comercializado somente na forma criopreservada. O processo de criopreservação altera a composição da membrana espermática e matrix extracelular, permitindo a retirada e a adsorção de proteínas na membrana (LEAHY e GADELLA, 2011). A criopreservação diminui gradualmente o conteúdo proteico de acordo com o aumento do tempo de congelamento na membrana espermática. Em um trabalho com búfalos a taxa de extração das proteínas foi maior nos espermatozoides recém congelados. A porcentagem total do conteúdo proteico dos extratos de membrana diminuiu variando de 30 a 40% após 24 meses de congelação (DHANJU et al., 2001). Neste estudo, estes aspectos não foram avaliados, pois as amostras foram obtidas de uma Central de Inseminação Artificial, a qual detém a patente para sexagem espermática no Brasil e não há informações sobre o tempo de armazenamento das palhetas, porém é possível que o mesmo processo de depleção possa ocorrer nas amostras de sêmen de touros. Uma proteína associada a fertilidade se mantém estável se os espermatozoides são armazenados em nitrogênio líquido por menos de 5 dias. O armazenamento por longos períodos (mais que 28 dias) reduz a quantidade proteínas quando comparado as amostras de sêmen fresco (LESSARD et al., 2000). Alguns *spots* encontrados podem estar relacionados as proteínas encontradas no diluente por conterem gema do ovo em sua composição como já descrito por Ollero et al., (1997) que em seu trabalho com eletroforese unidimensional de proteínas

de espermatozoides de bovinos relatam a presença de alguma bandas nas amostras de sêmen criopreservado que não estão presentes em amostras de sêmen fresco, os autores afirmam que estas bandas podem ser de origem das proteínas da gema do ovo que se aderiram a membrana espermática.

Embora tenha sido encontrada maior concentração de proteína total nas amostras com sêmen sexado, foi observada ausência de uma constelação que pode ter sido perdida ou menos expressa após a sexagem. Essas proteínas tem massa molecular entre 11 e 15 kDa. D'Amours et al. (2010) relataram uma constelação semelhante de proteínas na qual estavam presentes a BSP1 e BSP3. Tais proteínas são consideradas essenciais ao processo de fertilização e são associadas à resistência espermática à criopreservação (THERIEN et al., 1999; THOMAS et al., 2003; MOURA et al., 2006). As BSPs são secretadas pela vesícula seminal e se ligam a fosfolipídeos da membrana plasmática do espermatozoide durante a ejaculação (THÉRIEN et al., 1999, GREUBE et al., 2001; SWAMY, 2004). São proteínas ligadoras de heparina e por esta característica são moduladoras da capacitação e reação do acrossomo (THERIEN et al., 1999, THOMAS et al., 2003, MOURA et al., 2006). A citometria de fluxo pode induzir a um processo semelhante a capacitação espermática em touros (ARRUDA et al., 2012). Este fato pode estar relacionado a perda das BSPs, uma vez que estão inicialmente relacionadas a inibição da capacitação prematura (MANJUNATH et al., 2002). Ademais, as BSPs interagem com o epitélio da tuba uterina, mantendo a viabilidade e um reservatório espermático no trato reprodutor feminino o que pode estar relacionado a menor fertilidade (GWATHMEY et al., 2006) das células após o processo de sexagem, em vista da ausência ou menor expressam destas proteínas.

Em várias espécies de mamíferos as proteínas de membrana estão ligadas as proteínas do plasma seminal, essa ligação pode chegar em alguns casos a 35% (JOHNSON e HUNTER, 1972; RUSSELL et al., 1984). Dessa forma algumas proteínas estudadas podem estar relacionadas as proteínas de fertilidade encontradas no plasma seminal.

Na constelação de 11 a 15 kDa podem estar presentes também as aSFPs, Essa proteína é encontrada no plasma seminal de bovinos, tem importante papel na capacitação espermática e reconhecimento e ligação dos gametas (EINSPANIER et al., 1993). Segundo Roncoletta et al. (2006) há uma maior expressão desta proteína (com 15,1 kDa) nos touros de alta fertilidade.

Neste trabalho foram encontrados 3 *spots* com massa molecular entre 30 e 40 kDa nas amostras de sêmen convencional que não foram observados nas amostras de sêmen

sexado. Tais spots podem conter as P25bs, que são proteínas que atuam como moléculas de ligação à zona pelúcida (BÉRUBÉ e SULLIVAN, 1994; BOUÉ et al., 1994). Possuem massa molecular em torno de 30 kDa (GIROUARD et al., 2009) e são consideradas proteínas marcadoras da fertilidade (PARENT et al., 1999). Ademais os espermatozoides sexados utilizados neste trabalho são criopreservados, segundo Lessard et al., (2000) relataram em seus estudos o processo de criopreservação leva a perda desta proteína.

McNutt e Johnson (1996) demonstraram que a seleção por sexo em touros leva a perda de proteínas de membrana de 57 kDa. No presente estudo foram encontrados somente nas amostras de sêmen convencional dois *spots* com massa molecular de 55 kDa.

Diferentes perfis proteicos da membrana espermática após a sexagem tem sido também evidenciados em outras espécies. Em carneiros, Leahy et al. (2011), utilizando a eletroforese unidimensional, observaram na análise densitométrica proteínas com 28 e 30 kDa com bandas duplicadas em espermatozoides não sexados, e bandas únicas em espermatozoides sexados. Também foram encontrada uma quantidade três vezes maior de uma banda de 14 kDa em espermatozoides não sexados, quando comparados aos sexados. Esta banda foi identificada pela espectrometria de massa como fibronectina tipo 2 (Fn-2) e citocromo oxidase (Cox5a) e proteína associada a membrana espermática (SLLP1), proteínas envolvidas na manutenção da viabilidade e capacitação espermática. Apesar de ter sido um estudo em uma espécie diferente, assim como no presente estudo, os autores concluíram que as principais modificações no perfil proteico da membrana de espermatozoides sexados estão relacionadas às proteínas de baixa massa molecular.

## **Conclusões**

Embora a técnica de citometria de fluxo tenha resultados satisfatórios na sexagem espermática, os danos causados aos espermatozoides são irreparáveis, sejam eles pela exposição ao corante, temperatura e feixe de luz UV, pela pressão exercida pelo aparelho, ou mesmo pelo processo de criopreservação. Esses danos podem ser observados na alteração do padrão de proteínas o que pode estar relacionado a baixa fertilidade do sêmen sexado.

## **Agradecimentos**

À FAPESP pela concessão da bolsa. Processo FAPESP nº 2012/12190-6.

## Aspéctos Éticos

O estudo foi realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Institucional, sob protocolo nº 193/2011.

## Referências

- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, S.A.F.; AFFONSO F.J. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. *Animal Reproduction*, v.9, p. 345-353, 2012.
- BAKER, S.S.; CARDULLO, R.A.; THALER, C.D. Sonication of Mouse Sperm Membranes Reveals Distinct Protein Domains. *Biology of Reproduction*. v. 66, p. 57–64 2002.
- BÉRUBÉ B.; SULLIVAN R. Inhibition of *in vivo* fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 1255–1263, 1994.
- BEYHAN, Z.; JOHNSON, L.A.; FIRST, N.L. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high-speed flow cytometry. *Theriogenology*, v. 52(6), p. 1115-1116, 1999.
- BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S.J. *Preparation for protein isolation*. In: \_ Protein Methods. 2ª ed. New York: Wiley-Liss, 1996, p.1-26.
- BOUÉ, F.; BÉRUBÉ, B.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.; SULLIVAN, R. Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 577–587, 1994
- BYRNE, K.; LEAHY, T.; MCCULLOCH, R.; COLGRAVE, M.L.; HOLLAND, M.K. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics*, v. 12, p. 3559–3579, 2012.
- CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; NUNES DODE, M. A. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, p. 1346-1351, 2009.

- D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; FORTIER, M.; LECLERC, P.; SULLIVAN, R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction*, v. 139, p. 545–556, 2010.
- DHANJU, C.K.; CHEEMA, R.S.; KAUR, S.P. Effect of freezing on proteins and proteins profiles of sperm membrane extracts and seminal plasma of buffalo bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v 14, p. 1678-1682, 2001.
- EINSPANIER, R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; HENLE, T.; RÖPKE, R.; SCHAMS, D. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 98, p. 241-244, 1993.
- GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoal. *Biology of Reproduction*, v. 80, p. 965–972, 2009.
- GREUBE, A.; MÜLLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E.; HERMANN, A.; MÜLLER, P. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry*, v. 40, p. 8326-8334, 2001.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUARES, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 501-507, 2006.
- JOHNSON, W.L.; HUNTER, A.G. Seminal antigens: their alterations in the genital tract of female rabbits and during partial in vitro capacitation with P-amylase and Pglucuronidase. *Biology of Reproduction*, v. 7, p. 332-340, 1972.
- LEAHY, T.; GADELLA, B.M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, v. 142, p. 759–778, 2011.
- LEAHY, T.; MARTI, J. I.; CROSSETT, B.; EVAN, G.; MAXWELL, W. M. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm. *Theriogenology*. v. 75, p. 962–971, 2011.
- LESSARD, C.; PARENT, S.; LECLERC, P.; BAILEY, J.L.; SULLIVAN, R. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology*, v. 21, p. 700–707, 2000.
- 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.

- LIN, C.; TSAI, S. The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate, *Italian Journal of Animal Science*, v. 11, 2012.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 109-119, 2002.
- MCNUTT, T.L.; JOHNSON, L.A. Flow cytometric sorting of sperm: influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit. *Molecular Reproduction Development*, v. 43, p. 261-267, 1996.
- MIR N.A.; AND KUMAR P. Sperm sexing by flow cytometry –past improvements and future prospects: a review. *Journal of Animal Science*, v. p. 384-389, 2012
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of protein in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology*, v. 27, p. 201-211, 2006.
- MORRELL, J.M.; DRESSER, D.H. Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. *Mutation Research*, v. 224, p. 177-183, 1989.
- OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing -thawing process. *Theriogenology*, v. 49, p. 547-555, 1997.
- PARRILLA, I.; VÁZQUEZ, J.M.; CUELLO, C.; GIL, M.A.; ROCA, J.; DI BERARDINO, D.; MARTÍNEZ, E.A. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction*, v. 128, p. 615–621, 2004.
- RAJEEV, S. K.; REDDY, K. V. R. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Human Reproduction*, v. 19, p. 234-242, 2004.
- RONCOLETTA, M. *Perfil eletroforético das proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros*. Jaboticabal, 1999. 154p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- RONCOLETTA, M; MORANI, E. S.C., ESPER, C.R. BARNABE, V.H. FRANCESCHINI P.H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science*, v. 91, p. 77–87, 2006.
- RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N.; HUNT, W.; STRACK, L.E. Post-testicular surface

modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 30, p. 959-978, 1984.

SANCHO, S.; CASAS, I.; EKWALL, H.; SARAVIDA, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; FLORES, E.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction*, v. 134, p. 111–121, 2007.

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

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

SWAMY, M.J. Interaction of bovine seminal plasma proteins with model membrane and sperm plasma membranes. *Current Science*, v. 87, p. 203-211, 2004.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 590-598, 1999.

THOMAS, C.J.; ANBAZHOGAN, V.; RAMAKRISHMAN, M.; SULTAN, N.; SUROLIA, I.; SWAMY, M.J. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasma resonance study. *Biophysical Journal*, v. 84, p. 3037-3044, 2003.

UNDERWOODA, S.L.; BATHGATEA, R., EBSWORTHB, M.; MAXWELLA, W.M.C.; EVANSA, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 7–12, 2010.

## ANEXOS

### Normas editoriais para publicação na Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

#### Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

#### Formatação do texto

O texto não deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

#### Seções de um artigo

**Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

**Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

**Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

**Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco.

**Introdução:** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

**Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

**Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

**Tabela:** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

**Figura:** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

**Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

**Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, sem revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

**Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

**Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

### **Como referenciar:**

#### **1. Citações no texto**

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- Autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- Dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- Mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- Mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

**2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):**

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.
- FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.
- HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):**

- DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.
- LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).
- MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.
- NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.
- SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):**

- QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

- JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**Nota:** Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência e/ou "Aguardando liberação do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

### **Taxas de submissão e de publicação**

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$50,00 (cinquenta reais) deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$95,00 (noventa e cinco reais), por página impressa em preto e R\$280,00 (duzentos e oitenta reais) por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

### **Recursos e diligências**

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).