

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PARA ESCOLHA DO SEXO DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS¹

GUILLERMO PABLO ALMEIDA², RAFAEL HERRERA ALVAREZ³

¹Recebido para publicação em 12/12/02. Aceito para publicação em 14/06/03

²Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce, Universidad Nacional de Mar del Plata. Cc 276 (7620), Balcarce, Bs. As., Rep. Argentina. E-mail: gpalmeida@yahoo.com.ar

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP.

RESUMO: A separação dos espermatozóides portadores do complemento cromossômico sexual masculino (Y) e do feminino (X) constitui uma alternativa extremamente interessante para a indústria de produção animal devido à possibilidade de ganho econômico e gerencial, decorrente da escolha programada do sexo dos descendentes. Contudo, apesar de avanços consideráveis nas técnicas de separação dessas células, os resultados devem ainda ser aprimorados para tornar seu uso comercialmente viável. A presente revisão descreve o estado atual dos conhecimentos, incluindo as vantagens e desvantagens, das principais técnicas utilizadas para separar os espermatozóides Y e X, baseadas nas diferenças físicas e/ou químicas existentes entre ambas populações celulares. Das técnicas analisadas (imunológicas, eletroforéticas, de motilidade em meios viscosos, centrifugação em gradientes de densidade, entre outras), a citometria de fluxo aparece como a mais promissora devido ao alto grau de precisão de detecção e a viabilidade dos espermatozóides submetidos ao processo de separação. Para a indústria da inseminação artificial, o domínio da tecnologia de separação dos espermatozóides, visando a seleção do sexo dos animais domésticos, pode representar um impacto comparável ao obtido com o domínio da tecnologia de criopreservação do sêmen.

Palavras-chave: seleção de sexo, espermatozóides X e Y, produção animal, mamíferos, sêmen.

SPERMATOOA SEPARATION METHODS FOR THE CHOICE OF SEX IN DOMESTIC ANIMALS

ABSTRACT: The separation of sperm that bear the X or the Y chromosomal sexual complement represents an extremely interesting alternative in animal production industry, due to the possibility of economic gains and management enhancement by choosing the sex of the offspring. However, in spite of considerable advances in cell separation technologies, results must be improved in order to render possible its commercial use. This review describes the current knowledge about the principal techniques employed for Y- and X-sperm separation, based on the physical and/or chemical differences between these two cellular populations. Among the reviewed separation techniques (immunological, electrophoretic, swim-down in viscous media, centrifugation in density gradients, etc.), flow-cytometry appears the most promising, due to its high accuracy and the acceptable viability of sperm separated by these means. For the artificial insemination industry, the control of a simple and reliable sperm separation technology aiming the sex selection of domestic animal offspring, would suppose an impact comparable to that obtained when semen cryopreservation control techniques were attained.

Key words: sex selection, X and Y sperm, mammals, semen, animal production.

INTRODUÇÃO

Nos mamíferos (incluindo o homem e os animais domésticos) a proporção natural de nascimentos de um determinado sexo é da ordem de 50% (SEIDEL, 1999; SILVERSIDES, 2001). Escolher o sexo da própria descendência tem sido um constante desejo dos seres humanos. Conforme escritos de Demócrito de Abdera, os gregos do século V aC acreditavam que cada testículo dava origem a um dos sexos, e que a amputação do esquerdo, resultava no nascimento de filhos de sexo masculino, preferidos em sociedades altamente machistas como aquelas (HUNTER, 1995). Daquela época, até os dias de hoje, as práticas mais variadas (cabalísticas, dietéticas, etc.) têm sido usadas almejando a descendência preferencial de um ou outro sexo (GLEDHILL, 1988).

Em produção animal, a possibilidade de escolher o sexo da descendência permitirá obter maiores ganhos em produtividade (carne, leite, ovos, reprodutores geneticamente valiosos), além de permitir um melhor gerenciamento do sistema de produção (HOHENBOCKEN, 1999). Em rebanhos bovinos, caprinos e ovinos destinados à produção de leite, a seleção de sexo estará, preferencialmente, dirigida à obtenção de fêmeas. Assim, as perdas oriundas do nascimento de machos (50%) serão assim reduzidas ao mínimo e a produção de leite pode ser aumentada por meio da seleção genética exercida sobre as fêmeas (pressão de seleção), utilizando um menor número de reprodutoras.

Em rebanhos de corte, as práticas dirigidas à obtenção de machos permitirá um maior retorno econômico com igual número de animais. Devido às diferenças na carcaça, estima-se que abatendo bovinos aos 24 meses de idade, um lote de machos produz um retorno econômico 27% maior do que um lote com 50% de animais de cada sexo (RUVUNA *et al.*, 1992). Igualmente, em bovinos de corte, a seleção de sexo também permite obter fêmeas de reposição apenas das reprodutoras escolhidas para esse fim. Para esse objetivo devem ser utilizadas as melhores vacas do rebanho (GORDON, 1996). TAYLOR *et al.* (1985), porém, têm sugerido que o benefício econômico será maior, empregando para reposição as filhas de vacas de primeira cria (novilhas), descartando estas últimas logo após a desmama, por tratar-se de animais novos com possibilidade de obter um melhor preço. Em suínos, o sexo a ser escolhido dependerá da idade do abate. Se o abate for preco-

ce, os machos darão os maiores rendimentos, pela sua maior capacidade de crescimento. Entretanto, se o abate for tardio, a produção de fêmeas será mais conveniente, já que os machos adultos são mais agressivos e imprimem uma cor escura à carne (SILVERSIDES, 2001).

Em animais de alto padrão genético, a seleção do sexo poderia resultar em reprodutores machos novos (para uso ou para venda) usando como mães as fêmeas geneticamente superiores. HOHENBOCKEN (1999) realizou análises econômicas em rebanhos bovinos de leite e corte, nos quais propôs alternativas de uso de sêmen "sexado" para selecionar o sexo dos bezerras nas diferentes categorias de mães. As opções são diferentes dependendo do estabelecimento ter ou não como meta a venda de reprodutores machos de alto valor genético.

Por outro lado, a disseminação de técnicas de seleção do sexo da descendência usando espermatozoides específicos que transportam o cromossomo sexual X (espermatozoides X) ou Y (espermatozoides Y) deverá ser facilitada quando for incorporada a programas de Inseminação Artificial (IA). Com efeito, a sexagem do sêmen é uma das tecnologias mais esperadas pela indústria da IA. Entretanto, para o método poder ser comercialmente viável, VAN VLECK (1981) afirma que a técnica de sexagem de sêmen deve cumprir com várias condições: 1) ser inofensiva às funções dos espermatozoides. Isso significa que eles não percam ou diminuam sua motilidade, seu poder fecundante, a integridade do seu genótipo, nem sua capacidade de congelamento-descongelamento; 2) ser eficiente. Todas ou a maioria das células devem ser sexadas e o descarte ou perda de espermatozoides durante o processo deve ser o menor possível; 3) ter acuidade próxima a 100%; 4) ser reproduzível. Muitas das técnicas usadas foram abandonadas por não cumprirem com este quesito; 5) ser simples e rápida, ou seja, permita avaliar alto número de amostras em pouco tempo, e 6) deve ser barata o suficiente para permitir sua difusão no mercado. Nos últimos anos, a evolução de algumas técnicas permitiu avanços significativos em algumas dessas condições, contudo, nenhum método conseguiu reunir todas as condições necessárias para sua utilização prática.

A presente revisão objetiva descrever as técnicas mais promissoras de separação dos espermatozoides X e Y ("sexagem" de esper-

matozóides) destinadas à seleção do sexo dos mamíferos.

MÉTODOS DE SEXAGEM ESPERMÁTICA.

Segundo JOHNSON e WELCH (1999), os primeiros estudos realizados procurando separar as duas populações de espermatozóides remontam à década dos vinte, quando foi tentado, sem sucesso, a separação dos dois tipos celulares recorrendo à centrifugação de sêmen. Em anos recentes, graças ao acúmulo de conhecimentos sobre a estrutura dos espermatozóides X e Y, diversas técnicas de separação têm sido propostas explorando as diferenças químicas e físicas existentes entre essas duas populações celulares.

a) Métodos de sexagem espermática baseados nas diferenças químicas.

As técnicas de separação baseadas nas diferenças químicas recorrem à detecção de macromoléculas da membrana celular, denominados antígenos da superfície espermática, os quais estão relacionados com a presença do cromossomo X ou Y no núcleo. Até recentemente, a maioria dos trabalhos realizados foi direcionada à detecção do chamado antígeno HY (antígeno de histocompatibilidade menor cuja expressão está restrita ao cromossomo Y). Para separar os espermatozóides dos diferentes sexos, recorreu-se ao emprego de diversas técnicas imunológicas, utilizando anticorpos anti-HY.

Em camundongos, GOLDBERG *et al.* (1971) provocaram a lise de 50% dos espermatozóides “HY positivos” (HY+) utilizando complemento. Entretanto, experiências posteriores utilizando esse procedimento não conseguiram desviar a proporção 50:50 dos sexos (HOPPE e KOO, 1984), tendo obtido, no máximo, um desvio de 8% (ZAVOS, 1983). Segundo BRADLEY (1989), em murinos é possível obter até 90% de filhos machos quando as mães são inseminadas com espermatozóides liberados de colunas de imunoafinidade que retêm os espermatozóides “HY positivos”. Porém, não há publicação de outros trabalhos confirmando esses resultados. ALI *et al.* (1990) usaram imunofluorescência indireta (anticorpo monoclonal anti-HY, e segundo anticorpo com fluorocromo) e um citômetro de fluxo para separar espermatozóides HY+ e HY-. A avaliação realizada

logo após mostrou que das células (HY+) fluorescentes, 80% eram realmente portadoras do cromossomo sexual Y, e das não fluorescentes (HY-), 70% eram portadoras do X. Estes resultados, porém, também não foram confirmados.

PETER *et al.* (1993) utilizaram imunofluorescência indireta, como no caso de ALI *et al.* (1990) e, adicionalmente, acrescentaram pequenas esferas magnéticas cobertas de segundo anticorpo. Os tubos com as amostras foram passados por um sistema imantado, fazendo com que os espermatozóides magnetizados ficassem aderidos ao tubo. No líquido, 98% dos espermatozóides livres foram supostamente portadores do cromossomo sexual X (não fluorescentes). Entretanto, não foi realizada qualquer inseminação a fim de validar o sexo desses espermatozóides.

Outros estudos que tentaram a separação dos espermatozóides baseando-se no antígeno HY, não tiveram a exatidão esperada (OHNO, 1982; ZAVOS, 1983; HOPPE e KOO, 1984; HENDRIKSEN *et al.*, 1993). Provavelmente, isto deveu-se ao fato de o antígeno HY não ser totalmente específico dos espermatozóides Y; mesmo predominando nos espermatozóides Y, ele está presente em proporções variáveis nos espermatozóides X. A explicação seria que como o antígeno HY está presente nas espermatogônias (que são XY), ele poderia passar também aos seus descendentes X, durante a meiose (HOPPE e KOO, 1984). Outra possibilidade, seria que mesmo depois da segunda divisão meiótica, o ARNm responsável pela síntese do antígeno HY poderia passar das espermátides Y às espermátides X através das pontes intercelulares que se estabelecem entre células irmãs provenientes da mesma espermatogônia (BRADLEY, 1989). Em razão disso, parece que o futuro das técnicas imunológicas depende de encontrar na membrana dos espermatozóides outras substâncias antigênicas verdadeiramente específicas (marcadoras) dos cromossomos X e/ou Y.

Ao procurar substâncias antigênicas mais específicas que estivessem disponíveis na superfície espermática, BLECHER *et al.* (1999), obtiveram proteínas da membrana que purificaram por cromatografia de coluna, geraram anticorpos específicos, e anunciaram ter achado assim substâncias, chamadas de ‘Sex Specific Proteins’ (SSP), as quais seriam capazes de marcar cromossomos sexuais (X e Y). Nessa mesma linha de estudo, SOUZA *et al.*

(1999), mediante filtração em cromatografia de gel, prepararam anticorpos monoclonais contra uma proteína espermática que eles chamaram de “macho-específica”. Posteriormente, MATTÁ *et al.* (2001), usando complemento lisaram aproximadamente 50% dos espermatozoides bovinos da amostra e, com os restantes conseguiram 80% de embriões de sexo feminino. Esses resultados são animadores e oferecem um futuro promissor para essa técnica

imunológica de sexagem do sêmen.

b) Métodos de sexagem espermática baseados nas diferenças físicas.

As técnicas que utilizam diferenças celulares físicas para detectar e/ou separar os espermatozoides X e Y, foram bem descritas por PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA (2001), e estão sintetizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Técnicas usadas para detectar e/ou separar espermatozoides portadores do X e do Y, baseadas nas suas diferenças físicas*

Técnica Usada	Diferença Física Explorada nos espermatozoides
Corante de feulgen e microscopia ótica	Tamanho e morfologia da cabeça
Medição do pH dos fluidos (vaginal e/ou seminal)	Sensibilidade ao pH
Electroforese	Carga elétrica
“Swim down” em meios viscosos	Velocidade de migração em meios viscosos
Centrifugação em gradientes de densidade	Massa
Fluorocitometria de fluxo (intensidade da fluorescência)	Tamanho (por diferente conteúdo de DNA)

* Quadro adaptado de PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA (2001).

Diferenças morfológicas de espermatozoides humanos expostos ao corante de Feulgen foram encontradas por SHETTLES (1961). As cabeças dos espermatozoides com o suposto cromossomo sexual Y eram menores e ovais, enquanto que nos portadores do X eram maiores e arredondadas. Homens cujos ejaculados possuíam predomínio da primeira ou da segunda formas, tiveram mais filhas do que filhos e vice-versa, respectivamente. Nos animais, porém, não existem diferenças morfológicas detectáveis microscopicamente.

Os estudos vinculando o pH do sêmen à relação entre sexos da descendência, iniciaram na década dos trinta, quando foi sugerido que os espermatozoides X eram favorecidos em um meio vaginal ácido, e os espermatozoides Y no plasma seminal alcalino (PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA, 2001). SHETTLES (1970), medindo o pH do plasma seminal e do muco cervical confirmou aquela tendência, e ainda sugeriu que duchas vaginais ácidas (com

ácido acético) ou básicas (com carbonato de sódio) prévias ao coito podiam alterar a relação de 50:50 em um ou outro sentido. Em coelhos, WAKIM (1972) demonstrou que se o pH vaginal na hora do coito era levemente ácido (de 6,5 a 7,3), a descendência era predominantemente feminina, enquanto que se era alcalino (7,5 a 8,3), predominavam os filhotes machos.

Os trabalhos tentando a separação eletroforética dos espermatozoides baseados nas diferenças de carga elétrica (negativa) são também dos mais antigos (PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA, 2001). A técnica procura a separação dos espermatozoides X e Y pelas diferenças de velocidade de migração ao pólo positivo num campo elétrico (eletroforese). Inseminando coelhas com espermatozoides que tinham migrado ao pólo positivo, GORDON (1957) conseguiu produzir 62% de fêmeas, sugerindo que a carga elétrica negativa na superfície espermática era maior nas células com cromossomo sexual X. Em

humanos, KANEKO *et al.* (1984) e ISHIJIMA *et al.* (1991) obtiveram resultados semelhantes. Medindo, por espectrofotometria o “potencial zeta” das populações de espermatozóides previamente separadas pela eletroforese, ISHIJIMA *et al.* (1991) encontraram valores de -16 mV para os espermatozóides Y, e de -20 mV para os espermatozóides X.

Os estudos sobre diferenças na velocidade de migração consistem, basicamente, em depositar a amostra de espermatozóides na superfície de tubos ou pipetas contendo meios viscosos, chamadas de colunas, recuperando depois as células do fundo. Ao recuperar espermatozóides submetidos a concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA) ERICSSON *et al.* (1973) encontraram que 85% foram positivos à coloração de quinacrina (que cora especificamente a parte do cromossomo Y), ou seja, machos. Contudo, trabalhos posteriores utilizando a mesma metodologia de colunas de BSA, obtiveram resultados discordantes (EVANS *et al.*, 1975; ROSS *et al.*, 1975).

A centrifugação de espermatozóides através de meios de densidade crescente (gradientes) tais como Ficoll ou Percoll permite que as células de maior massa sedimentem mais rapidamente. O cromossomo sexual X contém uma maior quantidade de nucleoproteína do que o Y (SUMNER *et al.*, 1976). Devido a isso, os espermatozóides X teriam maior massa e estariam em maior número no sedimento, enquanto que os Y, estariam no sobrenadante. Entretanto, SHASTRY *et al.* (1977) observaram justamente o contrário ao utilizar Ficoll como gradiente. Dos espermatozóides encontrados no sedimento, 73-77% foram Y (corados pela quinacrina), enquanto que dos espermatozóides que permaneceram na interface, 75-80% eram X (não corados). Nos gradientes de Percoll, de maior nível de resolução de densidade, a maioria dos resultados foi consistente em que as células de maior massa (espermatozóides X) sedimentaram mais rapidamente. No trabalho de KANEKO *et al.* (1983), a quinacrina marcou como espermatozóides Y 73% das células da porção superior, e 27% da porção inferior. Por sua vez, IZUKA *et al.* (1987), só observaram 6,4% dos espermatozóides marcados como Y (com quinacrina) no sedimento.

Ao realizar fecundação *in vitro* (FIV) com espermatozóides bovinos centrifugados em gradiente de Percoll, IWASAKI *et al.* (1988) não obtiveram diferenças na relação entre sexos. Já HOSSEPIAN DE

LIMA *et al.* (2000) conseguiram 75% de exatidão separando espermatozóides bovinos por esse método. Quando inseminaram (FIV) com a fração inferior, 74,3% dos embriões foram fêmeas, conforme análise feita pela técnica de PCR.

Pela sua eficiência e baixo custo relativo, a separação de espermatozóides mediante centrifugação em gradientes de Percoll é uma técnica com possibilidades futuras de uso na seleção dos sexos. Deverá, contudo, ser melhorada a exatidão dela, e também a proporção de espermatozóides recuperados, que é relativamente baixa (25%).

A maior parte das técnicas de separação física descritas foi relegada por apresentarem limitações importantes, tais como efeitos deletérios sobre os espermatozóides, pouca exatidão, ou pouca repetibilidade (JOHNSON, 1988; BRADLEY, 1989; JAFAR e FLINT, 1996; PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA, 2001). Porém, a técnica da citometria de fluxo tem superado estas limitações primárias, constituindo-se no método de referência.

b.1) Sexagem de sêmen pela técnica de citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) é o método físico de separação de espermatozóides que tem hoje o maior reconhecimento. A CF explora o maior conteúdo de DNA do espermatozóide X em comparação ao espermatozóide Y. Esta diferença física é pequena e varia entre espécies, sendo em bovinos de apenas 3,7 a 4,2%, dependendo das raças (GARNER *et al.*, 1983).

Os primeiros trabalhos medindo diferenças na quantidade de DNA utilizando um fluorocitômetro de fluxo foram realizados na década dos 80 (PINKEL *et al.*, 1982). Um aparelho capaz de medir diferenças de volume entre células, chamado de citômetro de fluxo (FULWALER, 1965), foi modificado para medir diferenças celulares de fluorescência.

O processo começa fazendo uma coloração vital do DNA (corante fluorescente Hoechst 33342, uma hora a 37°C) no sêmen diluído em meio de cultura (JOHNSON *et al.*, 1987). Logo após, por pressão, o sêmen circula pelo citômetro de fluxo. No citômetro, o sêmen passa por um orifício estreito e à saída é rodeado por uma corrente líquida periférica (de PBS), também sob pressão. Isto faz com que os

espermatozóides fiquem presos (de um a um) no centro de um jato estreito. O jato passa por um dispositivo com secção de forma elíptica (RENS *et al.*, 1998), que posiciona a maior parte dos espermatozóides com suas caras planas no sentido do diâmetro maior da elipse. O jato passa então pelo raio laser, que produz a emissão da fluorescência do DNA.

A quantidade de fluorescência emitida por cada célula depende da sua orientação e quantidade de DNA. A fluorescência é captada por dois detectores colocados a 0 e 90 graus da linha de emissão laser. Ambos detectores estão conectados a um computador, sendo que o detector a 90 graus determina se os espermatozóides estão colocados corretamente (cara plana perpendicular ao laser) ou não, e o computador permite o posterior descarte dos espermatozóides em posição incorreta (VAN DEN ENGH e STOJKDIK, 1989). Já o detector a zero graus envia ao computador a intensidade de fluorescência que identifica o sexo espermático apenas nos espermatozóides posicionados corretamente. A menor intensidade corresponde aos espermatozóides Y, e a maior, aos espermatozóides X.

Um transdutor de ultra-som fraciona o jato de saída em gotas pequenas, contendo apenas um ou dois espermatozóides cada uma. O computador permite que um ionizador transfira carga negativa aos espermatozóides mais fluorescentes (espermatozóides X, em sua maioria), e positiva aos menos fluorescentes (espermatozóides Y, em sua maioria). As gotas sem espermatozóides ou com espermatozóides de fluorescência intermédia não recebem carga. Também não recebem carga as gotas que contêm espermatozóides mal posicionados. Em seguida, as gotas passam por um campo eletrostático em que os espermatozóides carregados negativamente, são atraídos pelo pólo positivo para constituir a fração sexada como espermatozóides X e vice-versa.

Existe ainda a fração 'descarte', constituída por gotas de PBS sem espermatozóides e os espermatozóides que não foram carregados devido à má posição, ou por apresentar fluorescência intermédia. As frações sexadas são coletadas em tubos contendo meio de cultura, onde os espermatozóides móveis migram para o fundo e os mortos ficam no sobrenadante. As frações do fundo devem ser ainda centrifugadas, antes de serem

diluídas novamente para serem usadas imediatamente ou eventualmente criopreservadas.

O primeiro trabalho que permitiu a separação de espermatozóides viáveis inteiros, por esse método, foi feito em coelhos por JOHNSON *et al.* (1989). Usando IA intra-uterina, os espermatozóides sexados X produziram 94% de fêmeas, e os considerados Y, 81% de filhotes machos. Em suínos, a exatidão foi de 74% para fêmeas e 68% para machos, após IA intra-tubárica (JOHNSON, 1991). Os primeiros bovinos "sexados" usando a FCF na separação do sêmen, foram obtidos por CRAN *et al.* (1993 e 1995), usando espermatozóides Y na FIV e posterior transferência dos embriões em receptoras, tendo obtido 90% de bezerros machos. Em 1995 nasceu o primeiro ser humano concebido usando sêmen sexado pela FCF, que foi do sexo masculino, conforme previsto (FUGGER, 1999), e em 1996 o primeiro cordeiro (CATT *et al.*, 1996). Entre 1996 e 1998, duas modificações foram incorporadas ao método de FCF, permitindo aumentar a velocidade da passagem celular e o correto posicionamento dos espermatozóides. A eficiência geral de separação passou assim de 350.000 para 6×10^6 espermatozóides de cada sexo/hora (JOHNSON *et al.*, 1999).

Embora os espermatozóides passem por várias agressões (coloração, incubação, pressão, exposição ao laser e centrifugação), SCHENK *et al.* (1999) não acharam maiores perdas de viabilidade quando compararam sêmen sexado criopreservado e sêmen criopreservado sem sexar. Mas o processo é ainda relativamente lento. Com todas as melhoras feitas ao sistema para acelerá-lo, só podem ser separados 6×10^6 espermatozóides de cada sexo por hora, ou descartando os espermatozóides Y, 18×10^6 espermatozóides X por hora (JOHNSON, 2000). Obter uma quantidade suficiente de espermatozóides sexados para uma só dose de IA convencional levaria de duas a várias horas. Devido a isso, somente são utilizadas doses de 1 a 1,5 milhões de espermatozóides, e o local de depósito, entanto que possível, deve ser intracornual profundo. Resultados preliminares mostraram que vacas inseminadas com sêmen sexado criopreservado apresentam taxas de prenhez 10 a 30% menores que as controle sem sexar (SEIDEL *et al.*, 1999).

Assim, a técnica não permite seu uso para inseminar grandes rebanhos e as aplicações do sêmen sexado requerem concentrações menores, tais

como injeção espermática intracitoplásmica (MEDVEDEV *et al.*, 1997), FIV (LU *et al.*, 1999), IA intra-tubárica (JOHNSON, 1991) ou então IA intra-uterina profunda (SEIDEL *et al.*, 1999). Porém, é de se prever que em poucos anos o aperfeiçoamento da técnica (aumento da velocidade da sexagem e diminuição da dose inseminante) fará com que essa técnica possa ser incorporada à rotina da IA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção do sexo da descendência pela sexagem de sêmen é hoje uma realidade. Mas sua aplicação comercial ainda não é possível.

Entre as numerosas técnicas de separação das populações espermáticas X e Y, a mais promissora atualmente é a citometria de fluxo (CF). Os espermatozóides sexados por este método, além de serem viáveis, podem ser congelados/descongelados com fertilidade aceitável. Pela sua alta exatidão, essa técnica é usada como método de validação para outras técnicas de separação. Em contrapartida, a CF apresenta ainda o inconveniente de precisar de um equipamento relativamente caro, ter baixa eficiência e ser relativamente lenta. Isto faz com que seu produto (sêmen "sexado") tenha um custo de mercado considerado elevado. Por esse motivo, seu uso fica restrito à inseminação *in vitro* de oócitos, os quais requerem um reduzido número de espermatozóides (caso de ICSI e FIV). Outro problema da técnica de CF é que pode ser potencialmente tóxica. Os possíveis efeitos deletérios inerentes à técnica (mecânicos, coloração vital do DNA, exposição ao laser) na viabilidade dos espermatozóides são hoje matéria de estudo, visto que, mesmo quando o dano estrutural e a perda de fertilidade não sejam importantes, não pode ser descartada a possibilidade de eventuais efeitos mutagênicos provocados pelo uso do raio laser, por exemplo.

Esses inconvenientes da técnica CF tornam a separação imunológica dos espermatozóides X e Y uma alternativa extremamente interessante. As técnicas imunológicas também precisam de pessoal especializado, mas seu custo logístico é bem menor, não são agressivas (exceto a lise) e mesmo com seu baixo rendimento atual, seria mais barato montar repetições simultâneas (em paralelo) com elas do que com a CF.

Existe a expectativa de que nos próximos anos

os métodos de sexagem de sêmen evoluam o suficiente para cumprir as condições requeridas para sua difusão comercial nos sistemas de produção animal.

AGRADECIMENTOS

À Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce (Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina) pela concessão de afastamento do primeiro autor junto ao Instituto de Zootecnia, em Nova Odessa, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, J.L., ELRIDGE, F.E., KOO, G.C. et al. Enrichment of X- and Y- chromosome-bearing sperm with monoclonal HY antibody-fluorescent-activated cell sorter. *Arch. Androl.*, New York, v.24, p. 235-245, 1990.
- BLECHER, S.R., HOWIE, R., LI, S., DETMAR, J. et al. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, Los Altos, v.52, p.1309-1321, 1999.
- BRADLEY, M.P. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.72, p.3372-3380, 1989.
- CATT, S.L., CATT, J.W., GOMEZ, M.C. et al. The birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracitoplasmic injection of a single presumptive "male" sperm. *Vet. Rec.*, London, v.139, p.494-495, 1996.
- CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., MILLER, N.G. et al. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. *Vet.Rec.*, London, v.132, p.40-41, 1993.
- CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. *Vet. Rec.*, London, v.135, p. 495-496, 1995.
- ERICSSON, R.J., LANGEVIN, C.N., NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*, London, v.246, p.421-424, 1973.
- EVANS, J.M., DOUGLAS, T.A., RENTON, J.P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature*, London, v.253, p.352-354, 1975.
- FUGGER, E.F. Clinical experience with flow cytometric

- separation of human X- and Y- bearing sperm. *Theriogenology*, Los Altos, v.52, p.1435-1440, 1999.
- FULWYLER, M.L. Electronic separation of biological cells by volume. *Science*, London, v.150, p. 910-911, 1965.
- GARNER, D.L., GLEDHILL, L., PINKEL, D. et al. Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, Champaign, v.28, p.312-321, 1983.
- GLEDHILL, B.L. Selection and separation of X- and Y-bearing spermatozoa. *Gam.Res.*, v.20, p.377-395, 1988.
- GOLDBERG, E.H., BOYSE, E.A., BENNETT, D. et al. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature*, London, v.232, p. 478-480, 1971.
- GORDON, I. *Controlled reproduction in cattle and buffaloes*. Wallingford, UK: CAB International, 1996. 500 p. vol.1.
- GORDON, M.J. Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.43, p.913-918, 1957.
- HENDRIKSEN, P.J.M., TIEMAN, M., LENDE, T. et al. Binding of anti-HY monoclonal antibodies to X- and Y- chromosome-bearing porcine and bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, v.35, p.189-196, 1993.
- HOHENBOCKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, Los Altos, v.52, p.1435-1440, 1999.
- HOPPE, P.C., KOO, G.C. Reacting mouse sperm with monoclonal HY antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro. *J. Reprod. Immun.*, v.6, p. 1-9, 1984.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M., RAMALHO, M.D.T., RODRIGUES, L.H. et al. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, p.480, 2000. (Abstr.)
- HUNTER, R.H.F. *Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals*. Cambridge: Cambridge U. Press, 1995. 310 p.
- IIZUKA, R., KANEKO, S., AOKI, R. et al. Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient and its clinical application. *Human Reprod.*, v.7, p.573-575, 1987.
- ISHIJIMA, S.A., OKUNO, M., MOHRI, H. et al. Potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int. J. Androl.*, Copenhagen, v. 14, p.340-347, 1991.
- IWASAKI, S., SHIOYA, Y., MASUDA, H. et al. Sex ratio of early embryos fertilized *in vitro* with spermatozoa separated by percoll. *Theriogenology*, Los Altos, v.30, p.1191-1198, 1988.
- JAFAR, S.I., FLINT, A.P.F. Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology*, Los Altos, v.46, p.191-200, 1996.
- JOHNSON, L.A. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- or Y-bearing sperm. *Theriogenology*, Los Altos, v.29, p.265, 1988. (Abst.),
- JOHNSON, L.A. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Dom. Anim.*, v.26, p.309-314, 1991.
- JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.93-107, 2000.
- 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. *Biol. Reprod.*, Champaign, v.41, p.199-203, 1989.
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P., LOOK, M.V. Flow cytometry of X- and Y-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gam. Res.*, v.17, p. 203-212, 1987.
- JOHNSON, L.A., WELCH, G.R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, Los Altos, v.52, p.1323-1341, 1999.
- JOHNSON, L.A., WELCH, G.R., RENS, W. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for fertilization and AI. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.82, (supp.2), p. 213-220, 1999.
- KANEKO, S., OSHIO, S., KOBAYASHI, T. et al. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, v.124, p.950-955, 1984.
- KANEKO, S., YAMAGUCHI, S., KOBAYASHI, T. et al. Separation of X- and Y-bearing sperm using percoll

- density gradient centrifugation. *Fert. Steril., Birmingham*, v.40, p.661-665, 1983.
- LU, K.H., CRAN, D.G., SEIDEL, G.E. Jr. In vitro fertilization with flow-citometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology, Los Altos*, v.52, p.1273-1280, 1999.
- MATTA, C.G.F.; SILVA, J.F.S., SILVA, C.L. et al. Imunosexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpo monoclonal contra uma proteína macho-específica. *Rev. bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*, v.25, p.402-404, 2001.
- MEDVEDEV, S., BOSSAK, J., ECKERT, J. et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flow citometrically sorted Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology, Los Altos*, v.47, p.270, 1997. (Abstr.)
- OHNO, S. Expression of X- and Y- linked genes during mammalian spermatogenesis. In AMMAN R.P., SEIDEL, G.E. (Eds.). *Prospects for sexing mammalian sperm*. Boulder: Colorado Assoc. Univ. Press, 1982. p. 109-113
- PEGORARO, L.M.C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Selección del sexo en mamíferos. In: PALMA, G.A. (Ed.). *Biotecnología de la Reproducción*. Balcarce, Argentina: Ediciones INTA, 2001. p. 317-351.
- PETER, A.T., JONES, P.P., ROBINSON, J.P. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: a rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the HY antigen. *Theriogenology, Los Altos*, v. 40, p.1177-1185, 1993.
- PINKEL, D., GLEDHILL, B.L., VAN DILLA, B.L. et al. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Citometry*, v.3, p.1-9, 1982.
- RENS, W., WELCH, G.R., JOHNSON, L.A. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y bearing sperm. *Citometry*, v.33, p.476-481, 1998.
- ROSS, A., ROBINSON, J.A., EVANS, H.J. Failure to confirm separation of X- and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature, London*, v.253, p.354-355, 1975.
- RUVUNA, F., TAYLOR, J.F., WALTER, J.P. et al. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines for producing bulls. *J.Anim.Sci., London*, v.70, p.1091-1097, 1992.
- SCHENK, J.L., SUH, T.K., CRAN, D.G. et al. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology, Los Altos*, v.52, p.1375-1391, 1999.
- SEIDEL, G.E. Jr. Sexing mammalian sperm and embryos - State of the art. *J. Reprod. Fertil., Cambridge*, v.52, p.1273-1280, 1999.
- SEIDEL, G.E. Jr. , SCHENK, J.L., HERICKOFF, L.A. et al. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology, Los Altos*, v.52, p.1407-1420, 1999.
- SHASTRY, P.R., HEGDE, U.C., RAO, S.S. Use of ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature, London*, v.269, p.58-60, 1977.
- SHETTLES, L.B. Factors influencing sex ratios. *J. Gynecol. Obstet.*, v.8, p.643-650, 1970.
- SHETTLES, L.B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. *Fert. Steril., Birmingham*, v.12, p.502-508, 1961.
- SILVERSIDES, D.W. Genetic manipulation of sex differentiation and phenotype in domestic animals. *Theriogenology, Los Altos*, v.55, p.51-63, 2001.
- SOUZA, C.J.P., MATTA, M.F.R. ; CRUZ, G.M. et al. Anticorpo monoclonal contra uma proteína macho-específica de 19 kDa em espermatozoides bovinos: uma metodologia promissora para imunosexagem. *Rev. bras. Zoot., Viçosa, MG*, v.28, n.1, p.74-78, 1999.
- SUMNER, A.T., EVANS, H.J., ROBINSON, J.A. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil., Cambridge*, v.48, n.1, p.9-15, 1976.
- TAYLOR, C.S., MOORE, A.J., THIESSEN, R.B. et al. Efficiency of food utilization in traditional and sex-controlled systems of beef production. *Anim. Prod., Edinburgh*, v.40, p.401-440, 1985.
- VAN DEN ENGH, G., STOKDIJK, W. Parallel processing data acquisition system for multilaser flow cytometry and cell sorting. *Citometry*, v.10, p.282-293, 1989.
- VAN VLECK, L.D. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In BRACKETT, B.G., SEIDEL, G.E., SEIDEL, S.M. (Eds.). *New technologies in animal breeding*. New York: Academic Press, 1981. p.221-242.
- WAKIM, P.E. Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, v.72, p.173-179, 1972.
- ZAVOS, P.M. Preconception sex determination via intravaginal administration of HY antisera in rabbits. *Theriogenology, Los Altos*, v. 20, p. 235-240, 1983.