

**FACULDADE PATOS DE MINAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

RENATO CARDOZO DA SILVA

**A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN SEXADO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA
EM FLUXO EM BOVINOS: uma revisão integrativa**

**PATOS DE MINAS
2022**

RENATO CARDOZO DA SILVA

**A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN SEXADO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA
EM FLUXO EM BOVINOS: uma revisão integrativa**

Trabalho apresentado à Faculdade Patos de Minas, como requisito parcial para a conclusão de Graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Gonçalves Pereira.

**PATOS DE MINAS
2022**



**ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CURSO, APRESENTADO POR
Renato Cardoso da Silva
COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MÉDICO VETERINÁRIO
DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA.**

Aos dias do mês e ano abaixo datado, reuniu-se, no Auditório Central (*online*), a Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade Patos de Minas, constituída pelos professores abaixo assinados, na prova de defesa de seu trabalho de curso intitulado:

A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN SEXADO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA EM FLUXO EM BOVINOS: uma revisão integrativa

Concluída a exposição, os examinadores arguíram alternadamente o graduando(a) sobre diversos aspectos da pesquisa e do trabalho, como REQUISITO PARCIAL DE CONCLUSÃO DE CURSO. Após a arguição, a comissão reuniu-se para avaliar o desempenho do(a) graduando(a), tendo chegado ao resultado, o(a) graduando(a)

Renato Cardoso da Silva

foi considerado(a) **Aprovado(a)**. Sendo verdade eu, Prof. Dr. Saulo Gonçalves Pereira, Docente Responsável pela Disciplina de TC do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, confirmo e lavro a presente ata, que assino juntamente com o Coordenador(a) do Curso e os demais Membros da Banca Examinadora.

Patos de Minas - Defesa ocorrida em sexta-feira, 24 de junho de 2022

Dr. Saulo Gonçalves Pereira
Orientador(a)

Defesa do trabalho em modo remoto, documento assinado pelo professor de TC como registro legal da defesa.

Dra. Eva Mendes Monteiro
Examinador(a) 1

Defesa do trabalho em modo remoto, documento assinado pelo professor de TC como registro legal da defesa.

Dr. Hugo C. Soares Melo
Examinador(a) 2

Defesa do trabalho em modo remoto, documento assinado pelo professor de TC como registro legal da defesa.

Prof. Dra. Sandra Regina Afonso Cardoso
Coordenadora do Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Prof. Dr. Saulo Gonçalves Pereira

Docente Responsável pela Disciplina de TC do Curso de Graduação em Med. Vet.

Dedico esta pesquisa aos meus pais que sempre estiveram comigo a todo tempo sem medirem esforços, nos momentos de luta e de glória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que sempre iluminou e abençoou o meu caminho para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, irmãos, filhos e amigos que sempre estiveram comigo quando eu não tinha mais forças para conseguir.

Aos meus amigos e colegas que durante esses 5 anos de estrada foram devotos e dedicados, e assim como eu, venceram essa trajetória, que teve muitos momentos difíceis, mas também como muitas alegrias e de brincadeiras.

Aos mestres pela satisfação e carinho em intermediar o conhecimento, o que fizeram com seriedade e disposição!

Agradeço, também, às empresas que me deram apoio nestes anos.

“A compaixão pelos animais é uma das mais nobres virtudes da natureza humana.”

Gerrard Fontani

A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN SEXADO POR CITOMETRIA EM FLUXO EM BOVINOS: uma revisão integrativa

THE USE OF SEXED SEMEN THROUGH FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE IN BOVINE: an integrative review

Renato Cardozo da Silva¹

Dr. Saulo Gonçalves Pereira²

RESUMO

Trata-se de trabalho de conclusão de curso visando discorrer sobre a citometria de fluxo, técnica para sexagem de espermatozoides em bovinos. Este método busca obter a sexagem do espermatozoide através da separação dos cromossomos X e Y, sendo possível realizar esse procedimento em razão da diferença de massa do DNA das células espermáticas. Após a separação, as doses são congeladas em paleta na dose de 2×10^6 , diferentemente da dose de sêmen convencional de 10×10^6 . Portanto, essa pesquisa possui especial justificativa acadêmica, pois o tema deve ser ainda bastante discutido devido aos contrapontos que ainda precisam ser ajustados com o desenvolvimento de mais pesquisas acerca do assunto. Assim, esta revisão teve como objetivo geral tratar sobre a técnica de citometria de fluxo para sexagem bovina. Para alcançar-se o objetivo geral, foi necessário delinear os seguintes objetivos específicos: expor sobre aspectos gerais da técnica citometria de fluxo para sexagem bovina; dissertar sobre as vantagens e desvantagens da utilização da técnica; analisar, através de uma revisão integrativa, estudos publicados eletronicamente no Google Acadêmico, similares ao tema e discutir sobre eles. Conclui-se, portanto, que a utilização de sêmen sexado é uma ferramenta biotecnológica que tem muito a acrescentar dentro da pecuária e esperasse com o desenvolvimento de mais estudos para aprimorar a habilidade da sexagem que os resultados futuros sejam bem mais promissores do que os resultados acompanhados recentemente. A técnica de citometria de fluxo é, ainda uma das mais usuais e mesmo havendo técnicas mais recentes é recomendada devido sua assertividade e custo, de acordo com as obras consultadas.

Palavras-chave: sêmen sexado, bovino, citometria em fluxo.

ABSTRACT

This is a course conclusion work aimed at discussing flow cytometry, a technique for sexing cattle. This method aims to obtain the sexing of the sperm through the separation of the X and Y chromosomes, being possible to perform this procedure due to the difference in the DNA of the sperm cells. After separation, the doses are frozen on a pallet at a dose of 2×10^6 , unlike the conventional semen dose of 10×10^6 .

¹ Graduando em Medicina Veterinária pela Faculdade Patos de Minas (FPM). *E-mail:*

² Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Patos de Minas, Biólogo Doutor em saúde animal (UFU). *E-mail:* saulo.pereira@faculdadepatosdeminas.edu.br

Therefore, this research has a special academic justification, as the topic must still be discussed a lot due to the counterpoints that still need to be addressed. adjusted with the development of more research on the subject. Thus, this review had the general objective of dealing with the flow cytometry technique for bovine sexing. In order to reach the general objective, it was necessary to outline the following specific objectives: to present general aspects of the flow cytometry technique for bovine sexing; discuss the advantages and disadvantages of using the technique; to analyze, through an integrative review, studies published electronically on Google Scholar, similar to the topic and discuss them. It is concluded, therefore, that the use of sexed semen is a biotechnological tool that has a lot to add within livestock and we would hope with the development of more studies to improve the sexing skill that future results are much more promising than the results. recently followed.

Keywords: sexed semen, bovine, flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de sêmen sexado vem aumentando no âmbito da bovinocultura. Já em 2011 eram vendidos aproximadamente 12 milhões de doses de espermatozoides. Esse número cresceu exponencialmente, estimando-se que sejam vendidas aproximadamente 600 a 800 mil doses de sêmens sexados. Muito embora isso, ainda é pequeno o número de animais submetidos a inseminação quando se comparado ao total de fêmeas em idade reprodutiva no rebanho brasileiro (VILLADIEGO, 2017).

Entretanto, os produtores adeptos às técnicas de biotecnologias da reprodução, têm intensificado o seu uso, buscando alternativas para melhorar seus índices produtivos. Nos sistemas de produção da pecuária de corte e leite, o sexo dos bezerros que nascem é um fator de grande importância para o desempenho econômico, por exemplo, quando ocorre o nascimento de machos na pecuária de leite, verifica-se uma redução na lucratividade, podendo aumentar os custos de produção (SERAFIM, 2018).

Nos últimos anos, estudos foram realizados com o objetivo de otimizar resultados, produzir bezerros de determinado sexo de acordo com o sistema de produção; e como ferramenta para buscar estes resultados estão sendo realizadas pesquisas voltadas a utilização de sêmen sexado. O interesse por sêmen sexado tem aumentado, porém, ao mesmo tempo que existem muitas oportunidades, seu uso ainda apresenta desafios e limitações em termos de custos e eficiência (CELEGHINI, 2017).

A técnica denominada citometria de fluxo foi desenvolvida no Laboratório de Livermore e denominou-se sexagem espermática por quantificação do DNA. No fim da década de 1960, esta técnica começou a ser utilizada com mais frequência, com o fim de acelerar a mensuração do DNA das células através de várias propostas, inclusive estudos com câncer. No tocante a reprodução, utilizou-se esse método para avaliar modificações dos espermatozoides ante aos danos genéticos (SCOTT, 2018).

Deste modo, esta pesquisa apresenta especial interesse acadêmico, pois o assunto tratado é polêmico, já que os estudiosos do tema dividem suas opiniões sobre os custos e benefícios da técnica de sexagem bovina denominada citometria de fluxo. Isto porque, alguns consideram que nascem poucos bezerros e aumentam os custos da produção. Por outro lado, outros consideram que a seleção de sexos é boa, pois melhora a viabilidade dos custos, produção e plano de negócios de um rebanho.

Assim, esta revisão teve como objetivo geral tratar sobre a técnica de citometria de fluxo para sexagem bovina e suas vantagens de acordo com percurso histórico publicados em trabalhos de renome.

Para alcançar-se o objetivo geral, foi necessário delinear os seguintes objetivos específicos: Expor sobre aspectos gerais da técnica citometria de fluxo para sexagem bovina; tratar sobre as vantagens e desvantagens da utilização da técnica; analisar, através de uma revisão integrativa, estudos publicados eletronicamente no Google Acadêmico, similares ao tema e discutir sobre eles.

2 METODOLOGIA

A Revisão Integrativa da Literatura é um método que permite a identificação, síntese e abordagem ampla na literatura sobre uma temática peculiar. Deste modo, utilizou-se as seguintes fases: delimitação do tema e construção do questionamento; busca por artigos atuais e semelhantes ao tema; classificação e análise dos artigos encontrados; abordagem dos resultados encontrados; análise crítica dos achados (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2020).

O artigo em questão, trata-se de uma revisão bibliográfica integrativa com busca sistemática. Para o caracterização geral a busca se deu em artigos, teses e dissertações, disponíveis no acervo eletrônico, publicados entre os anos de 2016 a 2022, disponíveis sites como: Google Acadêmico, Scielo, PubMed e periódicos de

revistas e livros, utilizando como palavras-chave: sêmen sexado, bovino, citometria de fluxo.

A busca integrativa ocorreu no período de recuperação foi de 2016 a 2022, sendo que o critério de inclusão dos 05 artigos gratuitos, em português. Dessa forma, elegeu-se como critério de inclusão aqueles que na plataforma do Google acadêmico contivessem os termos das palavras-chave e que tivessem mais de 05 citações de acordo com o critério de relevância da plataforma.

3 A TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO EM EMBRIÕES BOVINOS

3.1 Aspectos gerais

A inseminação artificial (IA) é considerada uma técnica amplamente difundida para maximizar a produção de bovinos, demonstrando-se resultados satisfatórios no tocante a seleção e aprimoramento genético de um rebanho. Entretanto, novos progressos biotecnológicos devem ser anexados a essa técnica, com fins de melhorar o que se utiliza no momento para melhoria genética do plantel (MEIRELLES, *et al.*, 2008).

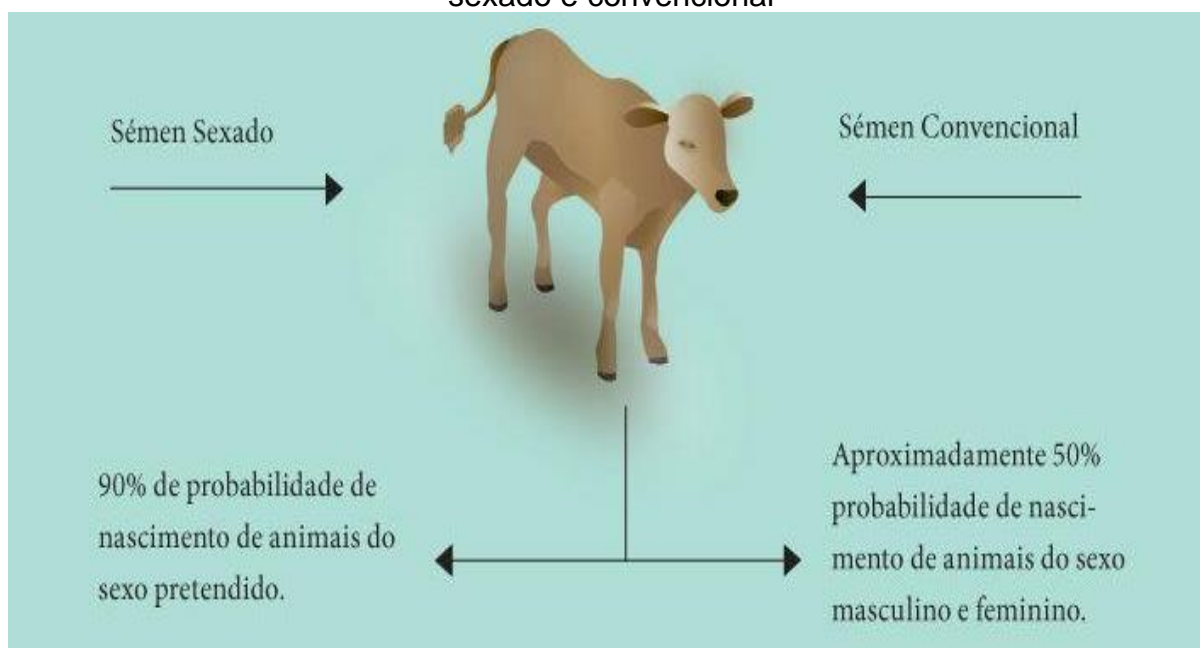
Sobre a potencialidade da comercialização de sêmen para inseminação artificial, Baruselli *et al.*, (2019) afirmam que:

O mercado nacional de inseminação artificial comercializou aproximadamente 7,0 milhões de doses de sêmen em 2002. Em 2018, esse mercado chegou a 15,4 milhões de doses de sêmen comercializadas, com crescimento de 220% nesse período. Ainda, em comparação com o ano anterior (2017), o mercado de comercialização de sêmen cresceu 13,7%. Para o cálculo do número de doses de sêmen comercializadas no Brasil, considerou-se os dados do INDEX ASBIA (que representa 90% do mercado de sêmen brasileiro), com ajustes para 100% do mercado. Esses dados demonstram claramente que a inseminação artificial ganhou espaço no Brasil com o passar dos anos (BARUSELLI, *et al.*, 2019, p. 2).

Desde 2004, o sêmen sexado pela técnica de citometria de fluxo é vendido no Brasil, sendo certo que os resultados quanto ao sexo dos bezerros são altamente acertados, estimando-se um mínimo de 85% das organizações que desenvolvem as técnicas (LIMA, *et al.*, 2011).

O sêmen sexado trata-se, basicamente, de um sêmen separado que contém espermatozoide apto a produzir animais machos ou fêmeas. A figura 1 explicita essa explicação:

Figura 1 – Diferença na probabilidade do sexo da ascendência recorrendo a sêmen sexado e convencional



Fonte: Fernandes e Rodrigues (2015)

De acordo com Seidel Jr. (2003), “[...] dentre as técnicas desenvolvidas para a sexagem de espermatozoides destacam-se a citometria de fluxo”, por sua vez Hossepian *et al.*, (2015) destacam sobre e os gradientes de densidade de Percoll® devido ao potencial biotecnológico da sexagem espermática para a produção animal.

Todavia ambas técnicas tratam da separação dos espermatozoides, todavia a técnica por citometria de fluxo permite o isolamento dos espermas, em conformidade com o cromossomo X ou Y. Essa tecnologia se funda na diferença das definições do conteúdo de DNA dos espermatozoides, já que em bovinos o cromossomo X tem cerca de 4% a mais de DNA do que o cromossomo Y (CARVALHO, *et al.*, 2009).

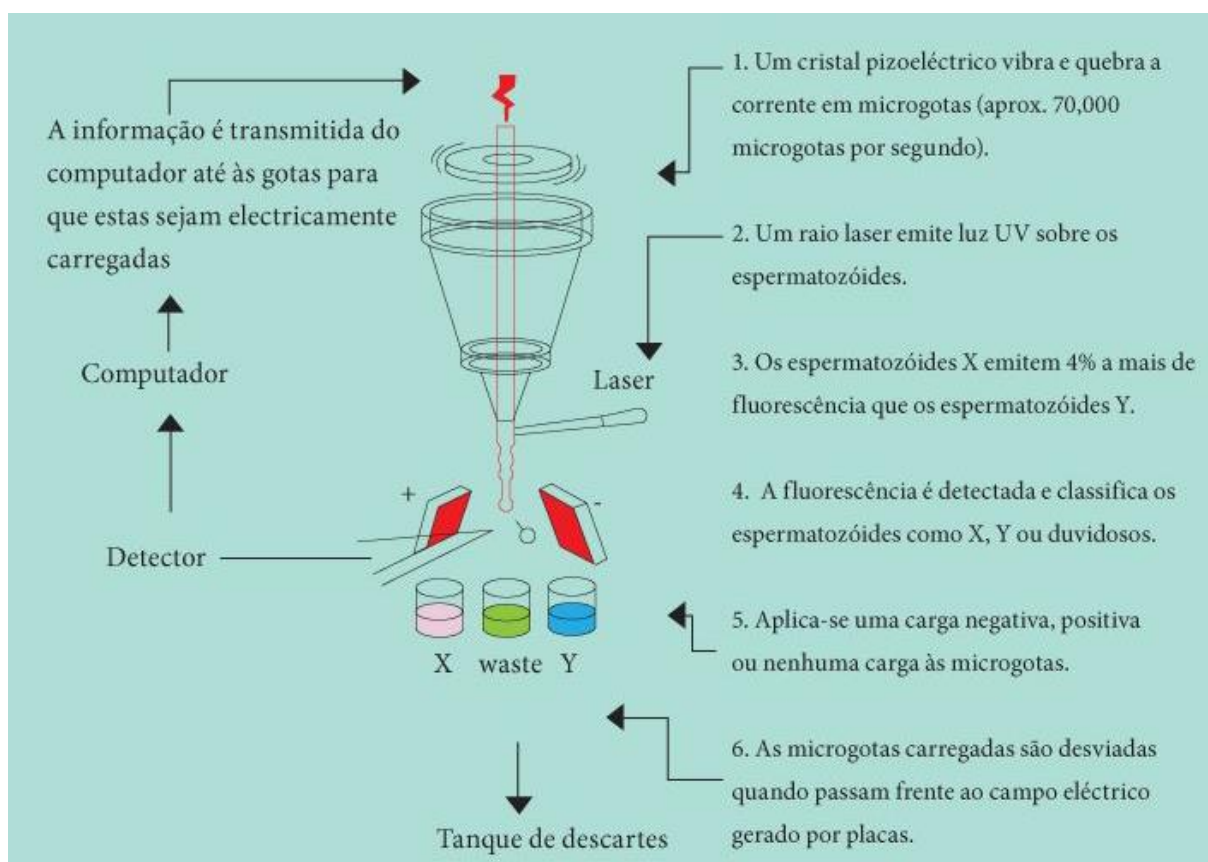
Segundo explicação de Fernandes e Rodrigues (2015, *online*):

O método avalia o conteúdo de ADN de cada espermatozoide, com o auxílio de um corante fluorescente específico de ligação ao ADN – Hoescht 33342. Os espermatozoides com cromossoma X contêm 3,8% mais de ADN do que os de cromossoma Y, logo sobre a ação do corante brilham mais. Após a coloração, as células espermáticas carregam-se eletricamente de acordo com a intensidade do seu brilho

e o aparelho faz a sua separação, direcionando os espermatozoides X para um terminal e os Y para outro. É uma técnica bastante exata, conseguindo-se obter 90% do espermatozoides contendo o sexo desejado (FERNANDES; RODRIGUES, 2015, *online*).

A ilustrar-se confira a Figura 2 desenvolvida por Fernandes e Rodrigues (2015, *online*), extraída do Portal de Agronegócios:

Figura 2 – Método da citometria de fluxo para obtenção de sêmen sexado



Fonte: Fernandes e Rodrigues (2015, *online*)

Em termos gerais, Carvalho (2009) assevera que a finalidade da sexagem de espermatozoides é mitigar o desperdício do rebanho, especialmente em se tratando da atividade leiteira. No mesmo passo, Hossepian (2007) acrescenta que muitos machos são sacrificados, implicando em problemas éticos e financeiros. Todo ano, mais de 600 mil bezerros machos são sacrificados, gerando um gasto relativo a 42 milhões de euros para os produtores britânicos, de acordo com a citação da época.

Para Lucio (2011), as vacas com alto potencial genético deveriam ser inseminadas com sêmen X, para que possam gerar fêmeas aptas a renovação de

plantel, ao passo que as outras seriam inseminadas com sêmen não selecionado, com menos custo, ou com sêmen Y de bovinocultura de corte, o que depende do valor da palheta do sêmen sexado, da disponibilidade do mercado para compra e venda de machos cruzados, e etc. .

3.2 Vantagens

São muitas as vantagens de utilizar-se o sêmen sexado, a exemplificar-se: melhor projeção da quantificação do rebanho; maximização dos lucros de carne e leite; melhor viabilidade em aferir a reposição de matrizes; diminuição de tempo na seletividade de plantéis; melhor visibilidade no desenvolvimento de testes de progênie etc. Contudo, há que se ressaltar que o sêmen sexado possui maior custo econômico que o tradicional, fazendo-se necessária uma avaliação financeira prévia quanto às vantagens do uso dessa tecnologia (VILLADIEGO *et al.*, 2017).

Segundo pesquisas realizadas por Luz *et al.*, (2000), a segurança financeira do uso dessa tecnologia na produção de ruminantes, verdadeiramente dependendo da somatória de bezerros produzidos, reduzindo-se com um sêmen menos saudável. Luz *et al.*, (1999) ainda asseveram que existiu uma queda expressiva na porcentagem de prenhez, ao usar-se o sêmen sexado ao invés do não sexado. Isso se deve à menor concentração de espermatozoides do sêmen sexado que é vendido pelas organizações do setor, que é expressivamente menor do que a do sêmen não sexado. Daí o motivo pela redução de fertilidade. Diante dessas justificativas, cabe ao produtor de sêmen medir o custo/benefício da implantação dessa tecnologia.

Os benefícios do sêmen sexado são incontáveis, todavia é preciso frisar que também existem restrições, que muitas vezes obstaculizam o uso dessa técnica. A tecnologia de citometria de fluxo leva a modificações na membrana espermática, antecipando o procedimento de reação acrossômica no espermatozoide depois da criopreservação (pré-capacitação).

Para Neves *et al.*, (2009) esse processo ocasiona uma diminuição do tempo de vida do espermatozoide sexado. Esse fenômeno motiva a retirada do sêmen junto ao lugar de fertilização, bem como na ocasião mais próximo possível à ovulação, podendo gerar maiores incidências de prenhez.

3.3 Desvantagens

As desvantagens desse complexo processo é pode gerar efeitos deletérios nos espermatozoides e danos irreversíveis em seu DNA, podendo comprometer, outrossim, a potencialidade positiva do espermatozoide durante o processo de fertilização e desenvolvimento de embriões. Ressalte-se, ainda, que essas mutações são transferidas para os embriões finais. Dessa forma, a sexagem através de citometria em fluxo pode resultar em oscilações nos níveis de clivagem (0 a 89%), de blastocistos (3,5 a 38,8%) e de prenhez após os 60 dias, diminuindo, portanto, o número de nascimentos (CARVALHO *et al.*, 2009).

No mesmo sentido estão as afirmações de Zanon (2016, p. 15):

Entre as desvantagens desta técnica, largamente utilizada nos dias atuais, podemos citar o alto custo de produção do sêmen (patente exclusiva), o tempo gasto (que pode chegar até a 9 horas, com $18-36 \times 10^6$ espermatozoides sexados por hora) para sexagem de um ejaculado, a alta quantidade de espermatozoides descartados (podendo chegar a 75% do ejaculado), menores índices de fertilidade quando comparado ao sêmen não sexado, maior quantidade de perda embrionária e maior taxa de retorno ao cio. A maior parte das perdas envolvendo a fertilidade do sêmen sexado se deve às lesões dos espermatozoides provocadas pelo procedimento de sexagem. Estas lesões podem ser tanto mecânicas, quanto pela presença do corante intracelular ou pelo tempo de exposição dos espermatozoides ao ambiente durante o procedimento. A presença destas perdas de fertilidade em relação ao sêmen convencional, descritas exaustivamente na literatura, incentiva a busca de aprimoramento constante da técnica e também o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a separação dos espermatozoides quanto à presença do cromossomo sexual (ZANON, 2016, p. 15).

Para se realizar a técnica de citometria de fluxo, Seidel Junior (2007) elencou 12 passos que interferem de sobremaneira em sua eficiência e segurança, bem como na quantidade total espermatozoides sexados extraídas de um ruminante. Com esses passos, ao final do processo, pode-se obter aproximadamente 22% dos espermatozoides, sendo metade de cada sexo, o que de fato, é uma quantidade ínfima, significando uma grande perda de espermatozoides.

Para consecução do método de sexagem por citometria por fluxo, Scott *et al.*, (2018) explicam que se utiliza uma aparelhagem de alto valor econômico e difícil de

encontrar, exceto se for no âmbito de contratação ou de licenciamento dos serviços de sexagem de espermatozoides da empresa *Sexing Technologies*.

4 ANÁLISE E DISCUSSÕES

O estudo foi constituído por 96 arquivos recuperadas no catálogo Google Acadêmico pertencentes a temática observada com as palavras-chave: sêmen sexado, bovino, citometria de fluxo, das quais apenas 05 compuseram a amostra por atenderem os critérios de inclusão. Todas as pesquisas foram retiradas da plataforma do Google Acadêmico. Em relação as publicações selecionadas, foram retiradas informações referentes ao título, autor, ano, país, delineamento, objetivos e principais resultados, sendo que, para melhor organização, cada um deles foi identificado com um número, conforme: (Quadro 1) (Quadro 2) (Quadro 3).

Figura 3 – Busca por ano e relevância no Google Acadêmico

The screenshot shows the Google Scholar search interface. The search bar contains the text "sexagem citometria fluxo bovinos". Below the search bar, it indicates "Aproximadamente 96 resultados (0,08 s)". On the left side, there are several filter menus:

- Artigos**: A dropdown menu showing "Artigos".
- Período específico**: A date range selector set to "2016" to "2022" with a "Pesquisar" button.
- Classificar por relevância**: A dropdown menu set to "Classificar por relevância".
- Em qualquer idioma**: A dropdown menu set to "Pesquisar páginas em Português".
- Qualquer tipo**: A dropdown menu set to "Artigos de revisão".
- Incluir patentes**: A checkbox that is unchecked.
- Incluir citações**: A checkbox that is checked.
- Criar alerta**: A button with a bell icon.

The search results are displayed in a list format. Each result includes a document type icon (e.g., [PDF], [HTML]), the title, author(s), year, and the source URL. The first three results are:

- [PDF] unesp.br**: "Uso de aptâmeros na **sexagem** de sêmen bovino" by JEO Zanon - 2016 - repositório unesp.br. The snippet mentions "12 passos que influenciam a eficiência da técnica e a quantidade total de espermatozoides **sexados**".
- [HTML] scielo.org.co**: "Sêmen sexado através de **citometria de fluxo** e centrifugação por gradiente de concentração" by FAC Viladiego, JD Guimarães, EP Da Costa - 2018 - scielo.org.co. The snippet mentions "estresse ao espermatozoide, e o decaimento de espermatozoides dos **bovinos** facilitam a sua separação por meio de **citometria de fluxo**".
- [PDF] emnuvens.com.br**: "Estudo sobre as diferentes técnicas de **sexagem** de espermatozoides" by C Scott, FF Souza, GB Mothé - 2018 - rvz emnuvens.com.br. The snippet mentions "método na **sexagem** imunológica. O método se baseia na incubação de espermatozoides **bovinos**".

The fourth result is partially visible: **[PDF] cbra.org.br**: "Evolução da utilização de espermatozoides **sexados**" by VFMH de Lima, RP Nocchi - 2019 - cbra.org.br. The snippet mentions "cromossomo X para **bovinos**, caprinos, ovinos".

At the bottom right of the page, there is a Windows watermark: "Ativar o Windows. Acesse Configurações para ativar o Windows."

Fonte: produzida pelo autor com base nos dados

Quadro 1 - Distribuição das teses quanto à identificação, título, autor, ano e delineamento (n=05)

NÚMERO	TÍTULO/ AUTOR	ANO/PAÍS	DELINEAMENTO
1	Uso de aptâmeros na sexagem de sêmen bovino - ZANON, José Eduardo de Oliveira	Brasil/ 2016	Revisão de literatura e experimental
2	Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração - VILLADIEGO, Faider Alberto Castaño <i>et al</i>	Colômbia 2017	Revisão de literatura
3	Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides – SCOTT, Caroline et al.	Brasil/ 2018	Revisão de literatura
4	Evolução da utilização de espermatozoides sexados – DE LIMA, Vera F.M. Hossepian	Brasil/ 2019	Revisão de literatura
5	Sêmen sexado bovino: a produção de embriões in vitro é influenciada pelo touro doador do material genético? SERAFIM, Priscila Rodrigues	Brasil/ 2017	Pesquisa de campo

Fonte: produzida pelo autor com base nos dados

Quadro 2 – Distribuição das pesquisas quanto aos objetivos

NÚMERO	OBJETIVOS
1	Os objetivos foram avaliar o uso de três aptâmeros desenvolvidos para se ligarem especificamente ao espermatozoide Y na separação magnética por sexo de espermatozoides de touro, e desenvolver uma técnica de qPCR que permita realizar facilmente o diagnóstico da proporção sexual em amostras de sêmen.
2	Apresentar uma revisão completa e atualizada sobre a origem do sêmen sexuado, os requisitos e as técnicas de sexagem espermáticas.
3	Conhecer melhor sobre a sexagem de espermatozoides bem como as técnicas utilizadas.

4	Demonstrar a eficiência do processo de sexagem por citometria de fluxo que separa os espermatozoides X e Y em função da mensuração do conteúdo de DNA.
5	Avaliar a possível influência do touro doador de sêmen sexado na taxa de formação de blastocistos e resultados de concepção de embriões produzidos in vitro.

Fonte: produzida pelo autor com base nos dados

Quadro 3 – Distribuição das pesquisas quanto aos objetivos

NÚMERO	PRINCIPAIS RESULTADOS
1	Os aptâmeros selecionados não produziram o efeito desejado de separação do sêmen conforme a presença do cromossomo X ou Y, nestas condições utilizadas, mas a diminuição da proporção relativa de Y em uma das frações não retidas indica ser possível a obtenção de resultados em novos testes e protocolos, com diferentes concentrações de aptâmeros e tempos de exposição do sêmen
2	A utilização da sexagem espermática tem obtido resultados na aplicação de biotecnologias da reprodução assistida, e com isso tem elevado o lucro no melhoramento genético e tem otimizado a produtividade no sexo escolhido. Entretanto, ainda existem muitas limitações, principalmente referentes ao tempo de exposição, o índice de aproveitamento e os resultados de índices de gestação em condições de campo. Por outro lado, a dose de sêmen sexado pode custar de duas a oito vezes o valor de uma convencional; da mesma forma, o seu uso avança no Brasil.
3	Das técnicas conhecidas a única que permite a comercialização das doses sexadas é a citometria de fluxo que apesar de propiciar 90% de separação ainda existem 10% de erro o que torna necessários mais estudos envolvendo a técnica.
4	Importantes modificações no processo de sexagem por citometria de fluxo, tais como pressão, intensidade do laser, diluidores tem levado à diminuição dos danos nos espermatozoides e aumentado a viabilidade dos mesmos.
5	Conclui-se que existe variação nas taxas de produção embrionária e na fertilidade de embriões produzidos in vitro de acordo com o touro doador do sêmen sexado.

Fonte: produzida pelo autor com base nos dados

Da detida leitura dos artigos selecionados, observa-se que o artigo 1 trata mais do que os conceitos de sexagem e técnicas de sexagens em bovinos. Zanon (2016) buscou analisar a utilização de 3 aptâmeros elaborados para se conectarem especificamente ao espermatozoide Y na separação magnética por sexo de espermatozoides de touro, e desenvolver uma técnica de qPCR que permita fazer com mais facilidade o diagnóstico da proporção sexual em amostras de sêmen.

No decorrer do estudo, Zanon (2016, p. 12) fez as seguintes observações quanto ao experimento:

Protocolos de separação por magnetismo utilizando aptâmeros biotinilados foram utilizados em sêmen comercial, e duas frações de espermatozoides foram obtidas para cada aptâmero testado (livre e retida). A proporção relativa de espermatozoides Y foi analisada em reações de qPCR desenvolvidas para este objetivo. A curva padrão utilizada na qPCR foi eficiente para a quantificação da proporção sexual relativa em amostras de sêmen convencional e sexado. Diferença significativa da proporção relativa de Y foi encontrada na fração de espermatozoides livres do aptâmero C12 em relação ao controle (47,7% vs. 51,3%, respectivamente; $P = 0,009$); as demais separações não apresentaram diferença significativa (ZANON, 2016, p. 12).

Ao final do estudo, entretanto Zanon (2016) concluiu que os aptâmeros separados não geraram o efeito almejado, em conformidade com a presença do cromossomo X ou Y, nas condições utilizadas. Todavia, o estudo apontou que a diminuição da proporção relativa de Y em uma das frações não retidas, evidenciam obter resultados em novos testes e protocolos, com diferentes concentrações de aptâmeros e tempos de exposição do sêmen.

Já os autores dos artigos 2 e 3, que elegeram como metodologia, a revisão de literatura, foram capazes de concluir que a utilização das técnicas de sexagem bovina de espermatozoides tem gerado resultados satisfatórios na bovinocultura, principalmente na seleção de animais machos. Contudo, ainda existem progressos a serem alcançados, pois muitos espermatozoides têm ficado muito tempo expostos, o que pode gerar desperdícios. Com isso, o custo-benefício pode não ser o ideal, podendo causar prejuízos a produção.

Nessa mesma linha de pensamento, Zanon (2016, p. 15) disserta que:

A maior parte das perdas envolvendo a fertilidade do sêmen sexado se deve às lesões dos espermatozoides provocadas pelo procedimento de sexagem. Estas lesões podem ser tanto mecânicas, quanto pela presença do corante intracelular ou pelo tempo de exposição dos espermatozoides ao ambiente durante o procedimento. A presença destas perdas de fertilidade em relação ao sêmen convencional, descritas exaustivamente na literatura, incentiva a busca de aprimoramento constante da técnica e também o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a separação dos espermatozoides quanto à presença do cromossomo sexual (ZANON, 2016, p. 15).

Já no artigo 4, Lima (2019) teve como objetivo demonstrar a eficiência do processo de sexagem por citometria de fluxo que separa os espermatozoides X e Y em função da mensuração do conteúdo de DNA. Sua pesquisa classifica-se como de revisão de literatura. No decorrer da pesquisa, Lima (2019, p. 2) afirmou que:

Basicamente, para a sexagem, o ejaculado é fracionado e os espermatozoides incubados em corante fluorescente com afinidade para DNA (Hoeschst 33342) por cerca de 1 hora. Este corante liga-se a dupla hélice evidenciando as diferenças de conteúdo de DNA entre os espermatozoides X ou Y. Os espermatozoides X ou Y são colocados no citômetro de fluxo e passam em fila única através de um tubo elíptico. No fim do trajeto os espermatozoides saem individualizados em gotas (devido à vibração durante o trajeto) e sobre elas incide um feixe de laser que evidencia a fluorescência. Os sinais fluorescentes emitidos pelo núcleo dos espermatozoides são coletados, simultaneamente, por detectores ópticos posicionados a 0° e 90° em relação a face plana e extremidades da cabeça, respectivamente. Os detectores convertem estes sinais para sinais elétricos que carregam positivamente e negativamente as gotas contendo o espermatozoide X ou Y, respectivamente, de acordo com a intensidade de fluorescência. As gotas passam por um campo eletrostático e são coletadas em dois tubos distintos de acordo com a carga elétrica. Esses tubos contêm tampões apropriados para manter a viabilidade espermática e preparar as células para o resfriamento. As gotas vazias e aquelas que não estão dentro dos padrões de fluorescência estabelecidos (que contêm mais que um espermatozoide) continuam no feixe central e caem em um tubo para descarte (LIMA, 2019, p. 2).

Lima (2019) foi exitoso em concluir sua hipótese pois teve como evidenciou que a produção de sêmen sexado de alta fertilidade precipitará o seu alto uso da bovinocultura, gerando a otimização do progresso genético. Ademais pode mitigar as perdas, melhorar o bem-estar animal e gerar mais lucros na produção.

Já o último artigo selecionado, foi elaborado por Serafim (2017) e trata-se de uma pesquisa de campo. Serafim (2017, p. 6) explicou como foi realizada a pesquisa:

Para este experimento foram utilizadas 29 vacas holandesas doadoras de embriões de uma única fazenda situada no município de Rio Vermelho/MG. As doadoras bovinas foram selecionadas de acordo com sua produção leiteira, histórico reprodutivo e mérito genético. As vacas foram submetidas à aspiração folicular e houve uma seleção dos ovócitos viáveis, que foram fertilizados com material genético sexado de fêmea de sete touros da raça Gir. A taxa de formação de embriões no cultivo *in vitro* e a taxa de concepção após a transferência de embriões (TE) foram computadas. Os resultados obtidos foram analisados através de teste Qui-quadrado utilizando software Graph Pad Prism Instat 5.0®, considerando nível de significância de 5% e tendências foram consideradas quando $0,05 < P < 0,10$. Foi observada grande variação na taxa de produção de embriões, que oscilou de 16,09% a 47,83%, com média de $31,97 \pm 8,57$, havendo tendência de influência do touro/sêmen sexado sobre as taxas de formação de blastocistos ($P=0.0659$). Na taxa de concepção dos embriões transferidos observou-se efeito significativo exercido pelo sêmen sexado ($p=0.0230$), com resultados oscilando entre 12,5% a 77,78%, na dependência do touro doador do sêmen (SERAFIM, 2017, p. 6).

Ao final da pesquisa, Serafim (2017) constatou que existe grande oscilação nos níveis de produção de embrião e na fertilidade de embriões produzidos *in vitro* em conformidade com o animais doador do sêmen sexado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da revisão de literatura apresentada, foi possível concluir que a utilização de sêmen sexado é uma ferramenta biotecnológica que tem muito a acrescentar dentro da bovinocultura. No entanto, os estudos precisam ser mais aprofundados pois existe muito desperdício de espermatozoides, danos irreversíveis no DNA separado, o que pode gerar prejuízos na produção e efeitos éticos, todavia a técnica de citometria é uma técnica com efetividade, inclusive financeira. Espera-se que com o desenvolvimento de mais estudos visando aprimorar a habilidade da sexagem que os resultados futuros sejam bem mais promissores do que os resultados acompanhados recentemente.

REFERÊNCIAS

- BARUSELLI, P. S. *et al.* Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p308-314%20\(RB812\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p308-314%20(RB812).pdf). Acesso em 10 mar. 2022.
- CARVALHO, J. O. **Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões**. 2009.109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.
- CARVALHO, J. O. *et al.* Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 1346-1351, out. 2009. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2009001000019>. Acesso em 01 mar. 2022.
- CELEGHINI, E. C. C. *et al.* Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Shirley-Florez/publication/316941034_Impacto_da_qualidade_do_semen_sobre_a_fertilidad_e_a_campo_em_bovinos_Impact_of_semen_quality_on_field_fertility_in_cattle/links/591a1d6c4585159b1a4bb485/Impacto-da-qualidade-do-semen-sobre-a-fertilidade-a-campo-em-bovinos-Impact-of-semen-quality-on-field-fertility-in-cattle.pdf. Acesso em 09 mar. 2022.
- DE LIMA, Vera FM Hossepián; NOCITI, Ricardo Perecin. Evolução da utilização de espermatozoides sexados. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, [S. L], v. 43, n. 2, p. 289-294, 2019.
- FERNANDES, J. R. C.; RODRIGUES, P. **Sexagem de sémen**. 2015. Disponível em: [http://www.agronegocios.eu/noticias/sexagem-de-semen/#:~:text=O%20processo%20de%20sexagem%20de,mais%20\(e%20melhores\)%20bezerras](http://www.agronegocios.eu/noticias/sexagem-de-semen/#:~:text=O%20processo%20de%20sexagem%20de,mais%20(e%20melhores)%20bezerras). Acesso em: 02 mar. 2022.
- HOSSEPIAN, V. F. M. L. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 219-228, 2007. Suplemento.
- HOSSEPIAN de LIMA, V.; RAMALHO, M.F.D.-T.; ALVES, B.C.A.; LUCIO, A.C.; OLIVEIRA, L.Z.; MOREIRA FILHO, C.A.; CARNEIRO, L.C. Enrichment of bovine semen with x-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. **Animal and Veterinary Sciences**, [S.L], v.3, n.1, p.1-7, 2015.
- LIMA, V. F. M. H. *et al.* Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. [S.L.], 8, p. 1680-1685, ago. 2011. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbz/a/KCrp9C7n6JjQrTYXJ8XxXvL/?lang=pt>. Acesso em: 03 mar. 2022.

LUCIO, A. C. **Expressão gênica diferencial em embriões bovinos produzidos in vitro com espermatozoides sexados por gradiente de densidade ou por citometria de fluxo**. 2011. 103f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Genético Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

LUZ, M. R. *et al.* Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro pela técnica de PCR multiplex. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 0, dez. 2000. Universidade de São Paulo, Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica (AGUIA). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000600006>. Acesso em: 03 mar. 2022.

MEIRELLES, C. *et al.* Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino. **Archives of Veterinary Science**, [S.L.], dez. 2008. ISSN 2317-6822. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/12888>. Acesso em: 03 mar. 2022.

NEVES, H. H. R. *et al.* Uso combinado de sêmen sexado e acasalamento dirigido sobre uma população de bovinos de corte submetida a seleção: estudo de simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 12, p. 2368-2374, 2009.

SCOTT, C. *et al.* Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 21–29, 2018. DOI: 10.35172/rvz. 2018.v25.25. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/25>. Acesso em: 3 mar. 2022.

SEIDEL JR, G.E. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v.79, n.3, p.145-156, 2003.

SEIDEL JUNIOR, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 3, p. 443-446, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.005>. Acesso em 15 mar. 2022.

SERAFIM, P. R. **Sêmen sexado bovino: a produção de embriões in vitro é influenciada pelo touro doador do material genético?** 2017. 35f. TCC (Graduação em Medicina Veterinária). São Paulo: Unisa, 2017. Disponível em: <http://dspace.unisa.br/bitstream/handle/123456789/304/UNIVERSIDADE%20DE%20SANTO%20AMARO%20-%20Priscila%20Serafim%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. acesso em 25 abr. 2022.

SOUZA, M. T.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**, São Paulo, ano 2020, v. 8, n. 1, p. 102-106, 31 jan. 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/ZQTBkVJZqcWrTT34cXLjtBx/?lang=en>. Acesso em: 31 jan. 2022.

VILLADIEGO, F. A. C. *et al.* Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração. **Revista de Medicina Veterinária**, [S.L.], n. 36, p. 121-133, 11 dez. 2017. Universidad de La Salle. <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5178>. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n36/0122-9354-rmv-36-00121.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2022.

ZANON, J. E. de O. **Uso de aptâmeros na sexagem de sêmen bovino**. 2016. 64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Araçatuba: Unesp, 2016. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/135901/zanon_jeo_dr_araca_int.pdf?sequence=4&isAllowed=yAcesso em 10 mar. 2022.