

LIMITAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO NA SEXAGEM DE SÊMEN BOVINO

Tais Alves Tavares¹, Joyce Caroliny dos Santos Lopes²

¹ Graduanda do curso de Medicina Veterinária Centro Universitário Unibras-Montes Belos, São Luís de Montes Belos-GO

² Docente do curso de Medicina Veterinária Centro Universitário Unibras-Montes Belos, São Luís de Montes Belos-GO
E-mail: taistavaresvet@gmail.com

Recebido em: 15/08/2024 – Aprovado em: 15/09/2024 – Publicado em: 30/09/2024
DOI: 10.18677/EnciBio_2024C8

RESUMO

A citometria de fluxo pode ser utilizada na sexagem de sêmen bovino por meio da análise das características físicas e químicas dos espermatozoides. Para realizar a sexagem de sêmen por citometria de fluxo, os espermatozoides são frequentemente marcados com corantes fluorescentes que se ligam à proteínas específicas ou componentes celulares presentes em diferentes quantidades nos espermatozoides X e Y. Esses corantes permitem que os espermatozoides sejam distinguidos e separados com base em seu conteúdo celular. O objetivo desta revisão de literatura foi contextualizar a utilização da citometria de fluxo na viabilidade espermática de bovinos e apontar suas limitações. Durante a citometria de fluxo, os espermatozoides são analisados enquanto passam por um feixe de laser, e os sinais de dispersão de luz e fluorescência são detectados por sensores. Com base nesses sinais, os espermatozoides X e Y podem ser diferenciados e contados, permitindo a determinação da proporção de espermatozoides de cada sexo nas amostras. Dentre as limitações da sexagem utilizando a técnica de citometria de fluxo estão longa exposição dos espermatozoides ao corante sob alta temperatura, exposição à alta pressão e à luz ultravioleta emitida pelo laser e rápida desaceleração na saída do citômetro. Além disso, o equipamento possui alto custo de aquisição.

PALAVRAS – CHAVE: Genética. Melhoramento. Reprodução. Viabilidade.

LIMITATIONS OF FLOW CYTOMETRY IN BOVINE SEMEN SEXING

ABSTRACT

Flow cytometry can be used in sexing bovine semen by analyzing the physical and chemical characteristics of sperm. To perform semen sexing by flow cytometry, sperm are often labeled with fluorescent dyes that bind to specific proteins or cellular components present in different amounts in X and Y sperm. on your cellular content. The objective of this literature review was to contextualize the use of flow cytometry in bovine sperm viability and point out its limitations. During flow cytometry, sperm are analyzed as they pass through a laser beam, and light scattering and fluorescence signals are detected by sensors. Based on these signals, X and Y sperm can be differentiated and counted, allowing the determination of the proportion of sperm of each sex in the samples. Among the limitations of sexing using the flow cytometry technique are long exposure of spermatozoa to the dye under high temperature, exposure to high pressure and ultraviolet light emitted by the laser and rapid.

KEYWORDS: Genetics. Improvement. Reproduction. Viability.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia reprodutiva de grande procura é a seleção do sexo na concepção em animais. Nos bovinos, a sexagem de espermatozóides em propriedades, especialmente em produtoras de leite, está na possibilidade do nascimento de fêmeas provenientes de acasalamentos programados, garantindo a reposição do rebanho (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Já para a produção de carne, o nascimento da progênie de machos é interessante porque os machos possuem 25% maior peso corporal do que as fêmeas. Considerando o melhoramento genético, a sexagem de espermatozóides permite o aumento de indivíduos machos ou fêmeas na progênie de uma população, permitindo a intensidade de seleção (CABRAL *et al.*, 2023).

Na América do norte, conseguir 10 machos seguidos acontece aproximadamente 1.000 vezes por ano, e o mesmo ocorre para 10 fêmeas consecutivas. Entretanto, há distorções nas proporções sexuais nas taxas de concepções de machos e fêmeas. Em bovinos, a inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE) resulta em 51% de machos, enquanto a fertilização *in vitro* (FIV) resulta em cerca de 54% de machos (SCOTT *et al.*, 2018).

Em vacas muito velhas ocorre a produção de cerca de 53% de bezerros machos. A gestão pode desempenhar um papel importante no manejo dos espermatozóides, pois rebanhos com manejo nutricional ruim resultam em 49% de machos, enquanto os rebanhos com manejo muito bom obtêm em média 53% de machos. Alguns autores sugerem que o momento da IA pode alterar a proporção sexual, no entanto, essas alterações devido à IA não estão confirmadas (LIMA; NOCITI, 2019).

Dessa forma, a sexagem permite aos produtores selecionar o gênero dos embriões produzidos, o que pode ser útil para controlar a proporção de machos e fêmeas no rebanho. Isso pode acelerar o progresso genético em direção a características como maior produção de leite, melhor conformação corporal ou resistência à doenças (QUELHAS *et al.*, 2021). No entanto, esse processo apresenta limitações quanto aos equipamentos de sexagem, como a citometria de fluxo (CARVALHO *et al.*, 2018).

A citometria de fluxo permite a análise simultânea de várias características das células, como tamanho, forma, complexidade, viabilidade, e expressão de proteínas ou outras moléculas. Isso possibilita a caracterização detalhada de

diferentes tipos de células em uma amostra. Apesar de ser uma técnica versátil, apresenta custos para implementação. Assim, serão vistas quais as limitações para utilização da citometria de fluxo na viabilidade espermática de bovinos (QUELHAS *et al.*, 2021).

O objetivo desta revisão de literatura foi contextualizar a utilização da citometria de fluxo na viabilidade espermática de bovinos e apontar suas limitações.

SEXAGEM EM BOVINOS

A sexagem de sêmen em bovinos é uma técnica utilizada na reprodução assistida para selecionar espermatozóides de um determinado sexo antes da inseminação artificial. Isso é possível devido à diferença no tamanho dos cromossomos sexuais X e Y nos espermatozoides (BONEYA, 2021).

Existem diferentes métodos de sexagem de sêmen, mas um dos que tem acurácia é o uso de citometria de fluxo, onde os espermatozóides são separados com base em diferenças na quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y. Os espermatozóides com cromossomos X (que resultarão em uma cria fêmea) tendem a ter mais DNA do que os espermatozóides com cromossomos Y (que resultarão em uma cria macho) (CABRAL *et al.*, 2023).

Essa técnica é especialmente útil na pecuária, permitindo aos produtores selecionar o sexo do animal que desejam produzir, dependendo de suas necessidades e objetivos de criação. Por exemplo, se um produtor quer aumentar o número de fêmeas no rebanho para reprodução ou para a produção de leite, a sexagem de sêmen pode ajudar a atingir esse objetivo de maneira mais eficiente (BONEYA, 2021).

Por isso, é importante entender como funciona a técnica e a viabilidade econômica da aquisição do equipamento. Além disso, apresenta diminuição da viabilidade espermática durante a sexagem utilizando a citometria (CABRAL *et al.*, 2023).

História da Citometria de Fluxo

Os esforços para quantificar os constituintes das células individuais começaram com medições de células em *slides*. Os quadrantes a serem medidos poderiam ser selecionados visualmente, e as medidas obtidas foram prontamente correlacionadas com o tipo de célula. O pioneiro neste trabalho foi Tjorborn Caspersson no Instituto Karolinska em Estocolmo e Robert Mellors no Instituto Sloan-Kettering em Nova Iorque, em 1880 (GARNER *et al.*, 2013).

Aos estudos de Caspersson seguiram a descoberta dos ácidos nucleicos por Miescher em 1897, a invenção do microscópio ultravioleta (UV) por Kohler em 1904, e a demonstração de Dhere (1906) de que bases purinas e pirimidinas de ácidos nucleicos absorveram luz UV a cerca de 260 nm. Medindo a absorção UV de células individuais intactas fotometricamente, Caspersson introduziu o conceito e começou a desenvolver as técnicas de citoquímica quantitativa. Ele demonstrou que as células metabolicamente ativas, incluindo as células cancerígenas, tinham maior capacidade nucleica com conteúdo ácido em 1936. Ele também mostrou bandas nos cromossomos por absorção UV (NANIWA *et al.*, 2019).

Posteriormente, Mellors foi o primeiro a usar lâmpadas fluorescentes corantes de ácido nucleico para corar e medir ácidos nucleicos intracelulares em 1950. Ele inventou um *scanner* microfluorométrico para escanear e medir as células em esfregaços de células esfoliadas, em 1951, e foi o primeiro a identificar células cancerígenas em um exame de Papanicolau quantificando o conteúdo de ácido

nucleico celular (YADAV *et al.*, 2018).

Foi o trabalho de Mellors em colaboração com o Dr. Papanicolaou, em 1952, que despertou interesse na citologia automatizada e levou ao financiamento deste esforço, primeiro pela *American Cancer Society*, e depois, pelo Instituto Nacional de Câncer. Mas os primeiros instrumentos e mesmo os posteriores, de melhor engenharia de escaneamento celular, microscópios de análise de imagem eram muito lentos e sofriam de uma série de limitações físicas (NANIWA *et al.*, 2019).

As fontes de luz laser ainda não tinham sido desenvolvidas, e os sistemas de análise de dados computacionais eram muito lentos para as enormes quantidades de dados que tiveram que ser analisados a partir de cada imagem de célula e preparados convencionalmente. Além disso, os *slides* apresentavam uma imagem confusa de células sobrepostas e artefatos (YATA, 2022).

A citometria de fluxo superaria pelo menos algumas dessas dificuldades por meio de medições globais de um número limitado de recursos principais em cada célula e por taxas de medição em centenas de células por segundo. A primeira tentativa de contar ou medir células que fluem em suspensão foi creditada à Moldávia em 1934. Ele descreveu um aparelho que consiste simplesmente em um microscópio que estava focado em um tubo de vidro capilar através do qual forçou uma suspensão de células, registrando a passagem de cada célula por um dispositivo fotoelétrico na ocular (NANIWA *et al.*, 2019).

Versões melhoradas deste instrumento foram descritas posteriormente por Cornwall e Davison em 1950 e por Bierne e Hutcheon em 1957. Os capilares eram facilmente obstruídos por agregados celulares e detritos nesses instrumentos, que Kamensky em 1965, conseguiu minimizar usando um canal em forma de gravata borboleta. No entanto, foi Crosland-Taylor, em 1953, mostrou que o entupimento poderia ser evitado usando um canal de grande diâmetro e centralizando o fluxo de células em uma bainha fluída usando o princípio do fluxo laminar (GARNER *et al.*, 2013).

Todos os canais de fluxo foram projetados desta forma. Os princípios hidrodinâmicos básicos que controlam o fluxo das partículas foram descritos por Kachel em 1990. O primeiro instrumento prático e clinicamente bem-sucedido para contagem (e mais tarde para análise) de células sanguíneas em suspensão foi projetado e patenteado por Walter e Coulter em 1949 (GARNER *et al.*, 2013).

Durante as próximas três décadas, o Coulter Counter foi usado rotineiramente em laboratórios clínicos em todo o mundo para fazer contagem de glóbulos brancos e vermelhos. As células suspensas em uma solução iônica são feitas para passar individualmente através de um orifício estreito entre dois eletrodos mantidos em uma diferença de potencial constante (NANIWA *et al.*, 2019).

A condutividade elétrica da suspensão é intencionalmente diferente daquela da célula, de modo que, à medida que a célula passa entre os eletrodos, altera-se a condutividade e gera um sinal elétrico. As contagens de glóbulos vermelhos foram realizadas em sangue total diluído e as contagens foram obtidas lisando os glóbulos vermelhos (MIR; KUMAR, 2012).

O Coulter Counter passou por uma série de melhorias ao longo dos anos, principalmente na eletrônica e projeto da câmara de contagem para que as células pudessem ser diferenciadas por tamanho à medida que fossem contadas. Em princípio, também era possível usar correntes elétricas moduladas para distinguir diferentes tipos de células com base nas diferenças em seus constituintes celulares, mas isso foi incorporado em um instrumento de sucesso comercial (NANIWA *et al.*, 2019).

Logo após os primeiros citômetros de fluxo terem sido projetados, reconheceu-se que as medições de fluorescência tiveram muitas vantagens sobre as medições de corantes absorventes. A fluorescência ofereceu uma sensibilidade muito maior, e nas concentrações de corante utilizadas para estudos de células biológicas não houve erro de distribuição. A fluorescência era essencial se alguém quisesse quantificar o antígeno e expressão de constituintes celulares, um requisito comum em experimentos e laboratórios clínicos, e dois ou mais constituintes diferentes poderiam ser medidos simultaneamente, algo que era difícil ou impossível de fazer com a absorção dos corantes (MIR; KUMAR, 2012).

Assim, com raras exceções, as fontes de luz e a óptica de todos os citômetros de fluxo estão otimizados para medições de fluorescência. As pesquisas utilizando os citômetros de fluxo foram projetadas e desenvolvidas em Los Alamos sob a liderança de Marvin Van Dilla. Como os instrumentos Kamensky, a excitação era ortogonal ao fluxo na posição ideal, assim como os detectores de fluorescência e sensores de dispersão possuíam fontes de luz laser de alta intensidade para todos serem interceptados. Na prática, é possível verificar com a fluorescência a quantificação e a intensidade de proteínas nas células de interesse, possibilitando a segmentação e classificação das células (JOSHI *et al.*, 2021).

Outras modificações foram feitas, incluindo alterações no projeto do canal de fluxo e um sensor Coulter incorporado com os sensores ópticos. Um sensor de dispersão multiangular foi usado para estudar a dispersão de luz como meio de classificação celular por Salzman em 1975. O sensor demonstrou que os principais tipos de glóbulos brancos no sangue periférico poderiam ser distinguidos por uma combinação de dispersão de luz direta e em ângulo reto, e esses recursos de medição são agora a base para o branco diferencial automatizado contadores de células sanguíneas no laboratório clínico (YADAV *et al.*, 2018).

O citômetro de fluxo Cytomat desenvolvido e fabricado na Block Engineering mediu simultaneamente pelo menos quatro parâmetros de fluorescência, absorção de UV, e dispersão de luz. O objetivo era fazer contagens de glóbulos vermelhos e brancos e com citoquímica muito sofisticada para fazer contagens diferenciais de glóbulos brancos. Foi uma maravilha da engenharia complexa, mas não um sucesso comercial. A excitação de laser duplo foi posteriormente incorporada no fluxo de citômetros de Los Alamos em 1979 (QUELHAS *et al.*, 2021).

A classificação celular foi adicionada aos primeiros citômetros de fluxo para dois propósitos: diagnóstico, isto é, para identificação visual de células selecionadas por citometria de fluxo; e preparativo, ou seja, coletar uma população pura de células com base em alguns recursos selecionados de citometria de fluxo. Kamensky pretendia demonstrar que havia identificado corretamente células cancerígenas em amostras de citologia cervical, e ele desenvolveu um classificador fluídico que desviou brevemente o fluxo para um canal lateral quando uma suposta célula cancerígena fosse detectada em 1967 (CARVALHO *et al.*, 2018).

A classificação era lenta e a célula desejada quase sempre estava misturada entre muitos outros contaminantes. Um classificador descrito por Mack Fulwyler em 1965 poderia separar células individuais do fluxo de células por deflexão eletrostática à medida que emergiam de um bocal de dimensionamento de células Coulter. O feixe de excitação foi focado no fluxo de células à medida que emergia do bocal do canal de fluxo, antes de quebrar em gotículas. Estas medidas do fluxo de células no ar eram surpreendentemente boas (ESPINOSA; CÓRDOVA, 2012).

Classificadores de células eletrostáticas de alta velocidade com excitação dupla a laser foram posteriormente projetados e construídos em Los Alamos em

1979, e usado para classificar cromossomos únicos para preparação de bibliotecas de genes em plasmídeos (ESPINOSA; CÓRDOVA, 2012).

Um instrumento comercial, Hemalog, foi projetado por Ansley e Ornstein em 1970 para identificar e classificar células coradas por luz absorção e dispersão em vez de fluorescência. Foi fabricado pela Technicon Corp. em Tarrytown, Nova York, e utilizou processamento paralelo de amostras através de diferentes canais em cada um dos quais um tipo específico de célula foi corado e contado. Este instrumento foi usado em vários laboratórios clínicos (YADAV *et al.*, 2018).

Ainda, outro projeto de citômetro de fluxo foi proposto por Steen em 1980. No seu instrumento, o fluxo fluido de células era direcionado para um local específico, na superfície de uma lamela de vidro no foco da objetiva do microscópio. Uma lâmpada de mercúrio ou xenônio foi usada para excitação do corante fluorescente. O instrumento Steen é atraente devido à sua simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade (MIR; KUMAR, 2012).

Uma das vantagens da imagem sobre a citometria de fluxo, talvez a vantagem mais significativa, é a pronta correlação com a classificação celular por luz convencional microscópica. Um dos principais objetivos da citometria tem sido combinar esta vantagem da citometria de imagem com a velocidade e precisão das medições por citometria de fluxo (YADAV *et al.*, 2018).

Isso foi aprimorado com um novo microscópio baseado e descrito por Kamensky e Kamensky em 1991. Este instrumento, um citômetro de varredura a laser (LSC) fabricado pela CompuCyte Inc., Cambridge, Massachusetts, faz medições do tipo citometria de fluxo de células em lâminas em impressões, esfregaços, suspensões de células ou seções de tecido. A velocidade e precisão da medição é comparável à da citometria de fluxo convencional (MIR; KUMAR, 2012).

As células são retidas na lâmina e podem ser medidas novamente em intervalos de tempo desejados para derivar a cinética de uma reação enzimática ou outra para cada um de qualquer número de células; e como a posição das células também é registrada, as células podem ser retidas e examinadas para alguma outra característica, ou para classificação por microscopia óptica convencional. Hoje, no mercado global existe uma diversidade de fabricantes detentores das patentes (YATA, 2022).

Conteúdo de DNA do Esperma

No gado, a cromatina de cada célula somática contém 60 cromossomos. Os gametas masculinos contêm metade desse número porque os esperma haploide portador do cromossomo X e Y que produz fêmeas carrega 29 autossomos mais o cromossomo X. Os espermatozoides haploides portadores do cromossomo Y têm os mesmos 29 autossomos mais o macho determinando o cromossomo Y (SILVA; GUERRA, 2019).

A diferença no comprimento total dos cromossomos bovinos entre touros e vacas é aproximadamente 4,2%. O avanço inicial ocorreu quando um dos laboratórios mais sofisticados do mundo, Laboratório Nacional Lawrence Livermore (LLNL), estudou os efeitos da radiação na saúde dos seres humanos usando esperma de rato como modelo para indicar danos ao DNA da linha germinativa. Estudos iniciais sobre a estabilidade do DNA de esperma de camundongo e de outros mamíferos, destaca que os resultados não eram alcançados devido ao achatamento do formato da cabeça do esperma (SERAFIM *et al.*, 2018).

Este problema foi superado pelo citômetro de fluxo que foi desenvolvido por

Dr. Daniel Pinkel, que orientou o esperma para que medições precisas do conteúdo de DNA poderiam ser feitas usando o lado achatado da cabeça do esperma (LIMA; NOCITI, 2019). Com isso, começou a ser possível obter DNA preciso do conteúdo medindo a cabeça do esperma primeiro, denominado medição coaxial, conforme utilizado pelo sistema que foi desenvolvido na Alemanha pela Partec GmbH. Foi este sistema (Impulso de Ortho Citofotômetro, ICP-22) que foi usado para fornecer o avanço nas análises de sêmen de touros em 1981 (MORAIS *et al.*, 2020).

Assim, a LLNL demonstrou o uso potencial de citometria de fluxo para identificar de forma convincente os espermatozoides X e Y das populações com base em suas diferenças de conteúdo de DNA (COLOMBO *et al.*, 2017). Posteriormente, o cientista Dr. Duane Garner mostrou que esta abordagem citométrica de fluxo foi capaz de determinar diferenças de conteúdo de DNA entre X- e Esperma Y de bovinos, ovinos, suínos e coelhos. Os espermatozoides, no entanto, foram mortos no processo de produção permeáveis à membrana utilizando corante fluorescente impermeável, 40-6-diamindino-2-fenilindol (DAPI) (LIMA *et al.*, 2018).

A seleção sexual em animais domésticos tornou-se uma questão, uma vez que a capacidade de determinar o sucesso da separação dos espermatozoides X e Y foi alcançado com análises citométricas de fluxo (COLOMBO *et al.*, 2017). O exame citométrico de fluxo do conteúdo de DNA de espermatozoides de gado com cromossomos X e Y mortos e com membrana desnudada (*Bos taurus* e *Bos indicus*) indicou uma diferença de cerca de 3,7%. De acordo com o cientista Dr. Duane Garner, a precisão desta citometria de fluxo foi suficiente para detectar diferenças no conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y entre cinco raças de gado (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

Diferenciação Sexual de Espermatozoides Vivos por Conteúdo de DNA

Em 1989, um grande avanço na sexagem de espermatozoides foi relatado por Johnson em seu grupo de pesquisa. O grupo do Centro de Pesquisa USDA Beltsville relatou produção de descendentes de espermatozoides de coelho vivos, separados por sexo. Esse foi o primeiro relatório verificado onde o sexo da prole havia sido predeterminado na concepção, classificando os espermatozoides vivos nas respectivas populações de espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y (VISHWANATH; MORENO, 2018).

Os espermatozoides foram corados e classificados de acordo com seu conteúdo de DNA, e então, inseminados cirurgicamente nos ovidutos de coelhas. A inseminação de espermatozoides com cromossomo Y separados por sexo resultou em 81% de machos (17/21), enquanto a inseminação de espermatozoides portadores do cromossomo X resultou em 94% de fêmeas (15/16). O DNA do esperma é corado estequiometricamente com Hoechst 33342, e então o esperma é bombeado em um fluxo na frente de um feixe de laser em comprimentos de onda específicos (KUMAR *et al.*, 2024).

O Hoechst 33342 iluminado, mancha o esperma e emite uma fluorescência azul muito brilhante. A fluorescência é rapidamente medida usando um tubo fotomultiplicador (PMT) enquanto o esperma flui em fila única na frente do PMT. Um computador de alta velocidade é usado para analisar fluorescência relativa das populações de espermatozoides X e Y à medida que fluem através do instrumento em uma corrente fluídica (SEIDEL; DEJARNETTE, 2022).

Um vibrador de cristal é usado para quebrar o fluxo em gotículas individuais, muitas das quais contêm esperma. Os espermatozoides corados com fluorescência são classificados por DNA conteúdo colocando cargas opostas em gotículas

contendo esperma X daqueles contendo esperma Y. As gotículas passam do positivo e do negativo por campos elétricos, e como cargas opostas se atraem, e as gotículas são separadas em dois fluxos para coleta (KUMAR *et al.*, 2024).

Um terceiro fluxo de gotículas sem carga é descartado; essas gotículas contêm espermatozóides que não puderam ser sexados com precisão (mais da metade), sem esperma, raramente dois espermatozóides, bem como espermatozóides mortos. A eliminação do esperma morto é uma vantagem valiosa deste processo. Esta tecnologia de classificação de esperma é conhecida como Tecnologia de Sexagem de Esperma de Beltsville e foi patenteada pelo USDA por Dr. Lawrence Johnson como inventor em 1991 (KUMAR *et al.*, 2024).

Disponibilidade Limitada de Esperma Sexuado

A dose de inseminação comumente usada para bovinos geralmente é de $20 \cdot 10^6$ ou mais espermatozoides criopreservados. Inicialmente, separando os espermatozóides X e Y por sexo por citometria de fluxo teve uma séria limitação porque os instrumentos utilizados para classificar espermatozóides individuais pelo seu conteúdo de DNA foram muito lentos para produzir números adequados para uso em inseminação artificial (BONEYA, 2021).

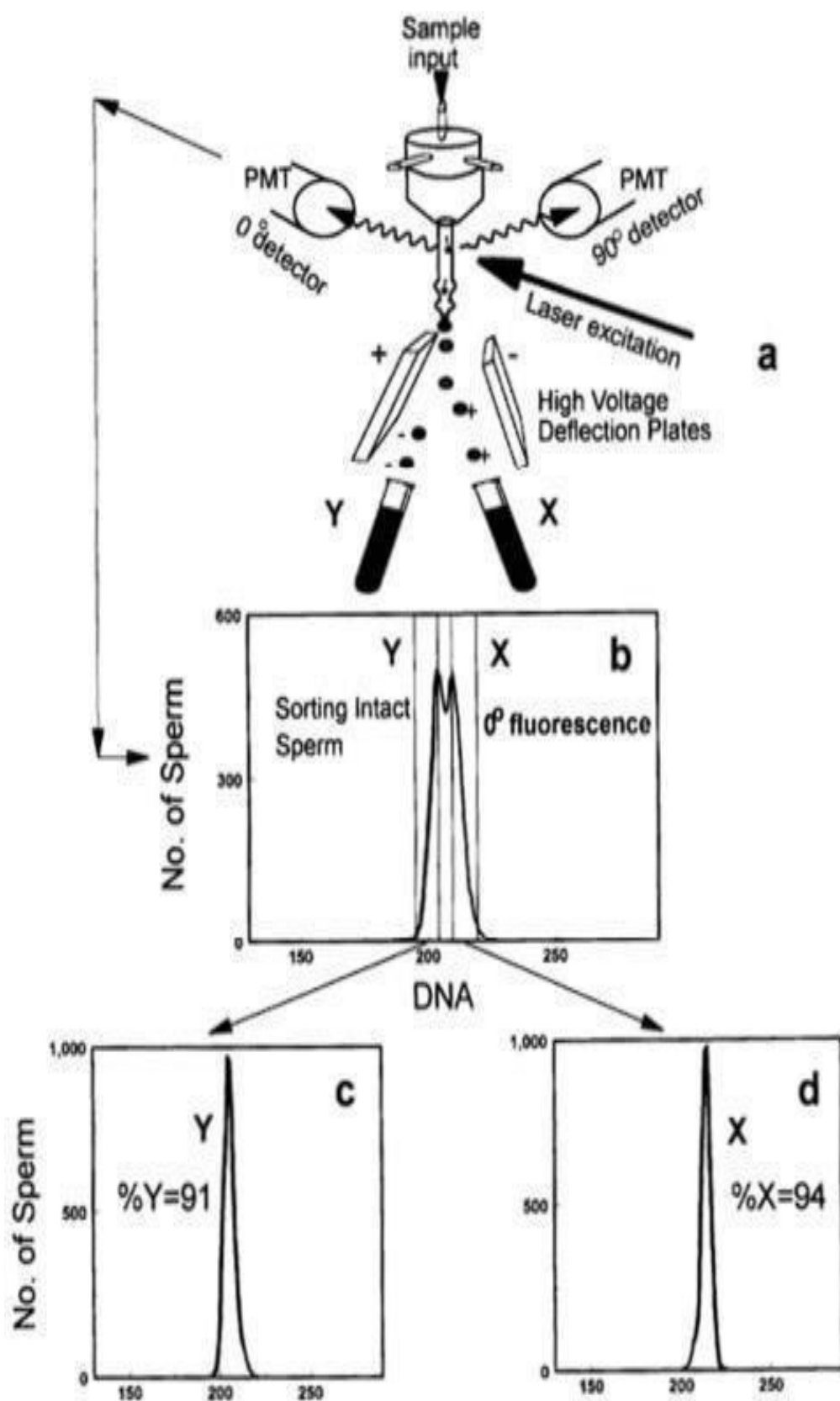
No início um sistema de sexagem de esperma só conseguia separar cerca de 400.000 espermatozóides por hora. Assim, levaria 25 horas para separar uma dose de inseminação de $10 \cdot 10^6$ esperma de cada sexo. Estudos sobre o número mínimo de esperma por dose de inseminação seria necessário para atingir taxas de gravidez aceitáveis em bovinos (HALL; GLAZE JUNIOR, 2014).

Técnica de Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo possui alto valor agregado e de utilização restrita, tendo em vista que gasta aproximadamente 30 minutos para sexar uma dose de sêmen, mostrando que a utilização comercial não é viável. A utilização da citometria de fluxo para produção do sêmen sexado bovino tem sido eficiente no resultado do sexo escolhido dos bezerros. No uso deste sêmen tem-se observado melhorias na programação das populações do rebanho, maior ganho direcionado para produção de leite e carne, além de facilidade na reposição de matrizes. Além disso, há ganhos genéticos com redução no tempo na seleção de plantéis (QUELHAS *et al.*, 2021).

A principal diferença entre espermatozóides X e Y advém da quantidade de DNA dos mesmos. Assim, a utilização do método possibilitou a mensuração da quantidade individual de DNA de cada célula espermática pela fluorescência emitida pelo corante Hoechst 33342 que se liga ao DNA. Devido a uma diferença na quantidade de DNA, os espermatozóides X, após serem expostos a esse corante fluorescente, apresentam um brilho maior do que os espermatozóides Y (Figura 1) (CARVALHO *et al.*, 2018)

FIGURA 1 – Separação de espermatozoides pelo citômetro de fluxo com laser e placas de deflexão



Fonte: Cabral *et al.* (2023) baseado em Johnson; Welch (1999).

Dentre as desvantagens da citometria de fluxo estão que muitas células são cultivadas enquanto se aderem às estruturas de *scaffolds* e placas de cultura de tecidos ou a tecidos ou estruturas com outras células, tendo em vista que as células são dissociadas de seu ambiente, e sua expressão de proteína pode mudar; os dados sobre a morfologia celular não podem ser acessados, bem como a localização dos marcadores moleculares na célula; a tensão causada nas células durante a citometria de fluxo pode afetar sua capacidade de continuar crescendo após a análise, em que um grande número de células não sobrevive ao processo (CARVALHO *et al.*, 2018).

Além disso, as ferramentas de medição usadas em um citômetro de fluxo limitam a visualização dos dados quantitativos em gráficos, isto é, a avaliação visual das células é praticamente impossível. Com essas desvantagens, uma solução tem sido a complementação da técnica com imuno-histoquímica das células em seu ambiente. Entretanto, a maioria das ferramentas de análise de imagem não consegue fornecer o mesmo nível de dados quantitativos (CABRAL *et al.*, 2023).

Os espermatozóides são analisados por citometria de fluxo (Figura 1 a), quanto ao seu conteúdo de DNA, coletando informações de fluorescência, que são proporcionais ao conteúdo de DNA da face achatada da cabeça do espermatozóide. Esta informação é coletada no detector de fluorescência de 0" (uma modificação). O detector de fluorescência de 90" é usado, para determinar como o esperma é orientado. As janelas de classificação (Figura 1 b) em torno do esperma com cromossomo Y, mais escuro e do esperma com cromossomo X, mais brilhante são usadas, para determinar quais espermatozóides são coletados. A validação do esperma classificado é feita, reanalisando alguns dos espermatozóides de ambas as frações coletadas, Y (Figura 1 c) e X (Figura 1 d) (CABRAL *et al.*, 2023).

Após a coloração com corante, as amostras são diluídas, na proporção de 1:1, em meio Tris, suplementado com 4% de gema de ovo e 0,0015% de corante alimentar e filtrado, através de um filtro de 50µm, para remover detritos ou células aglutinadas antes da triagem. As amostras são submetidas ao citômetro de fluxo (MoFlo SX, Beckman Coulter, USA), projetado para a sexagem espermática de alta velocidade (20.000 células/s), operado a 40psi, com laser pulsado de diodo sólido, a 125mW, com fluido da bainha bovina. As comportas são ajustadas, para atingir 90% de pureza e os espermatozoides sexados são classificados em meio Tris. Depois de ser refrigeradas a 4 °C por 90 min., os espermatozóides sexados são centrifugados e diluídos em Bioxcell, para alcançar a concentração de 2 x10⁶ espermatozoides/mL (IMV, L'Aigle, France). Por fim, o sêmen é envasado em palhetas de 0,25mL e congelados para o uso posterior (CARVALHO *et al.*, 2018).

Após esses procedimentos, os espermatozóides passam numa fila única que contém um separador com campo elétrico, sendo direcionados para um tubo de coleta por meio da diferença de cargas elétricas positivas ou negativas. É importante citar que a velocidade de separação dos espermatozóides X e Y é lenta, cerca de 3000 a 4000 células por minuto para cada sexo. Os espermatozóides são conduzidos através do aparelho em velocidades que se aproximam aos 90 km/h e a pressão de 50 psi ao deixar o "nozzle" (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

Esta alta pressão e suas sequelas comprometeriam a viabilidade e a motilidade do espermatozóide, realizando redução da fertilidade. Com testes anteriores, a diminuição da pressão durante o processo de separação de 50 para próximo dos 40 psi aumentou a sobrevivência dos gametas após o "sorting" mantendo a precisão na separação dos espermatozóides carreadores do cromossomo X ou Y. Por meio da separação dos espermatozóides pela

citometria de fluxo, conseguiu-se pureza de 90% do sexo desejado (COOKE *et al.*, 2014).

Na utilização da sexagem pela técnica de citometria de fluxo com posterior criopreservação, o ejaculado a ser utilizado deve conter motilidade mínima de 60% e vigor 3 numa escala de 0 a 5, e morfologia $\geq 75\%$ de espermatozóides normais, além disso, avaliação morfométrica e estrutural da cromatina dos espermatozoides (NANIWA *et al.*, 2019).

Limitações Durante a Sexagem e Custo de Aquisição do Equipamento

A técnica de sexagem em citometria de fluxo pode provocar danos aos espermatozóides, em decorrência da utilização do laser, da grande pressão na passagem pelo citômetro, da queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e permanência em temperatura ambiente por algumas horas antes do processamento (CABRAL *et al.*, 2023).

As doses comerciais de sêmen sexado apresentam concentrações inferiores ao convencional. O padrão de movimentação espermática é alterado durante a separação no citômetro de fluxo, pois existe a dificuldade de sedimentação dos espermatozoides após a seleção por *Percoll* nos procedimentos de produção *in vitro* de embriões, resultando em menor recuperação do número de células, e com a concentração inadequada, há restrição na quantidade de oócitos que poderiam ser fecundados (QUELHAS *et al.*, 2021).

Os fatores que promovem a diminuição da viabilidade espermática de acordo com Cabral *et al.*, (2023) são:

- 1- longa exposição ao corante sob alta temperatura (pelo menos uma hora a 37°C);
- 2- exposição à alta pressão e à luz ultravioleta emitida pelo laser;
- 3- rápida desaceleração dos espermatozóides na saída do citômetro, de 90Km/h para 0Km/h, quando estes são colhidos nos tubos coletores durante o processo de sexagem.

Com a diminuição da eficiência de sexagem de espermatozóides descongelados, pois o congelamento prejudica a uniformidade da coloração dos núcleos, têm-se uma restrição na utilização dos melhores touros (touros provados), com a especificidade de cada raça, nos programas de melhoramento animal e teste de progênie que utilizam a produção *in vitro* de embriões (CARVALHO *et al.*, 2018).

A baixa concentração espermática após a seleção de gradiente *Percoll* está relacionada com baixas taxas de clivagem, e por consequência, taxas diminuídas de blastocistos comparando com a produção de sêmen não sexado. É evidente que os espermatozoides sexados por citometria de fluxo comprometem a taxa de prenhez. Assim, estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen é desafiador para se obter um benefício efetivo incluindo idade ao primeiro parto, frente ao custo de utilização do equipamento (SINGH *et al.*, 2019). Dessa forma, cerca de 150 a 200 doses de sêmen enriquecidas com espermatozóides X podem ser produzidas, por dia, por citometria de fluxo, que é a técnica utilizada comercialmente, o que compreende menos que 0,5% das necessidades diárias de doses de sêmen do mercado (COOKE *et al.*, 2014).

Esta afirmação atrelada à taxa de prenhez de novilhas a campo em torno de 35-40% e 55-60% utilizando sêmen sexado e convencional, respectivamente, são fatores limitantes para a utilização do sêmen sexado. É difícil concluir como seriam os resultados no Brasil, tendo em vista que é uma pecuária caracterizada por

heterogeneidade de condições de manejo, utilizando doses com concentrações baixas (2.10^6 espermatozoides/dose) comparando-se com doses com concentrações de mais de 15.10^6 espermatozoides/dose que são utilizadas em programas de IA (SINGH *et al.*, 2019).

Neste sentido, no Brasil é fundamental optar por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem em torno de 75%, mas que permita, em condições variadas de manejo, alcançar índices de fertilidade satisfatórios. Além disso, 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 (KUMAR *et al.*, 2024).

É importante citar que 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 visem a sexagem de espermatozoides bovinos e outras espécies de interesse zootécnico (SINGH *et al.*, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de sêmen sexado é interessante para o desenvolvimento da produção animal, pois possui capacidade de garantir maior produtividade, maximizando o progresso genético, uso mais racional dos animais e aumento dos lucros no sistema de produção, e com isso, minimizar as perdas. Dentre as limitações da sexagem utilizando a técnica de citometria de fluxo estão longa exposição ao corante sob alta temperatura, exposição à alta pressão e à luz ultravioleta emitida pelo laser e rápida desaceleração dos espermatozoides na saída do citômetro, quando estes são colhidos nos tubos coletores durante o processo de sexagem.

Além disso, apresenta alto custo de aquisição, não sendo viável para grande parte dos produtores brasileiros. As técnicas de sexagem têm evoluído, sendo de melhor aproveitamento com o uso da inseminação artificial em tempo fixo *in vivo*, principalmente após emprego da criopreservação de sêmen. Portanto, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas e mais pesquisas são necessárias, para aprimorar e até desenvolver novos métodos, que possam atender ao mercado de forma acessível.

REFERÊNCIAS

BONEYA, G. Sexed semen and major factors affecting its conception rate in dairy cattle. **International Journal of Advanced Research in Biological Science**, v. 8, n. 1, p. 99107, 2021.

CABRAL, L. A. R.; PACHECO, W. B.; SANTOS, S. S. . A. dos; PRADO, A. da S.; NUNES, J. F. Técnicas de sexagem espermática e sua importância na produção animal. **Ciência Animal**, v. 33, n. 2, p. 118 a 130, 2023. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/11042>.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Different ways to evaluate bovine sexed sperm in vitro. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 199-206, 2018. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a603ff7783717068b4656>

COLOMBO, A. H. B.; CAVALIERE, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A.; MORESKI, D. A. B.; BOTELHO, A. C. F. A. *et al.* Avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco

ambiental. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 1, p. 81-89, 2017. Disponível em:

<https://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123456789/586/1/ANTONIO%20HUGO%20BEZERRA%20COLOMBO.pdf>

COOKE, R. F.; BOHNERT, D. W.; CAPPELLOZZA, B. I.; MARQUES, R. S.; DELCURTO, T. *et al.* Incorporation of sexed semen into reproductive management of cow-calf operations. **Livestock science**, v. 163, p. 165-171, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141314001024>
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.02.015>

ESPINOSA, C R.; CÓRDOVA, I. A. Sexing sperm of domestic animals. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 1-8, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829354/> Doi:10.1007/s11250-012-0215-0

GARNER, D. L.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Spermatogenesis: Methods and Protocols**, p. 279-295, 2013. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-038-0_26 Doi:10.1007/978-1-62703-038-0_26

HALL, J. B.; GLAZE JUNIOR, J. B. System application of sexed semen in beef cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 3, p. 279-284, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10735086/>
Doi: 10.1016/s0093-691x(99)00227-7

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1323-1341, 1999.

JOSHI, H.; MATHUR, M.; MOHANTY, A.K.; KUMAR, S.; KAUSHIK, J.K.; *et al.* Semen sexing in bovine: Current status and the need to develop alternative techniques. **Animal Reproduction Update**, v. 1, n. 1, p. 17-31, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/355870035_Semen_Sexing_in_Bovine_Current_Status_and_the_Need_to_Develop_Alternative_Techniques
Doi:10.48165/aru.2021.1203

KUMAR, S.; MAGOTRA, A.; KUMAR, M.; DALAL, D.S.; KUMARI, S.; Semen sexing and its impact on fertility and genetic gain in cattle. **Zygote**, p. 1-10, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38501286/#:~:text=Concerning%20genetic%20gain%20with%20use,a%20mild%20increase%20in%20inbreeding.>
Doi: 10.1017/S0967199424000066

LIMA, N. C.; SOUZA, G. H. S.; COELHO, J. A. P. M.; AGUIAR, J. E.; Inovações tecnológicas em genética bovina e maturidade gerencial dos pecuaristas. **Revista Gestão & Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 67-89, 2018. Disponível em: <https://revistagt.fpl.emnuvens.com.br/get/article/view/1440>
Doi: <https://doi.org/10.20397/2177-6652/2018.v18i3.1440>

LIMA, V. F. M. H.; NOCITI, R. P. Evolução da utilização de espermatozoides sexados.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 43, n. 2, p. 289-294, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343593296_EVOLUCAO_DA_UTILIZACAO_DE_ESPERMATOZOIDES_SEXADOS
Doi:10.22533/at.ed.84520110816

MIR, N.; KUMAR, P.; Sperm sexing by flow cytometry—past improvements and future prospects: A review. **Wayamba Journal of Animal Science**, v. 1322909353, p. 384-389, 2012. Disponível em: <https://wayambajournal.com/paper/sperm-sexing-by-flow-cytometry-aepast-improvements-and-future-prospects-a-review.pdf>

MORAIS, S. B.; ORLANDI, C. M. B.; GASPAROTTO, P. H. G.; DANTAS FILHO, J. V.; CAVALI, J. *et al.*; Custos e benefícios da inseminação artificial em pequenas propriedades leiteiras. **Agrarian**, v. 13, n. 48, p. 249-264, 2020. Disponível em: <https://ojs.ufgd.edu.br/agrarian/article/view/10652>
Doi: <https://doi.org/10.30612/agrarian.v13i48.10652>

NANIWA, Y.; SAKAMOTO, Y.; TODA, S.; UCHIYAMA, K.; Bovine sperm sex-selection technology in Japan. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 18, n. 1, p. 17-26, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmb2.12235>
Doi: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12235>

NASCIMENTO, P. S.; CHAVES, M. S.; SANTOS FILHO, A. S.; GUIDO, S. I.; GUERRA, M. M. P. *et al.*; Produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 Girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 358-368, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/9KGQ3Lq6F8BQZXM4r3b3bFC/>
Doi <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i332156>

QUELHAS, J.; SANTIAGO, J.; MATOS, B.; ROCHA, A.; LOPES, G. *et al.*; Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X-and Y-chromosome-bearing sperm. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 5, p. 1633-1641, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34037311/> Doi: 10.1002/vms3.540

SCOTT, C.; SOUZA, F. F.; MOTHÉ, G. B.; ARISTIZABAL, V. H. V.; DELLAGUA JUNIOR, J. A.; Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 21-29, 2018. Disponível <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/25> Doi: <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.25>

SEIDEL, J.R.; G. E.; DEJARNETTE, J. M.; Applications and world-wide use of sexed semen in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106841, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34507848/#:~:text=Though%20the%20primary%20application%20of,evolving%20or%20are%20under%20consideration>. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106841

SERAFIM, P. R.; GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M.; BORN, J. L. B.; BORGES, M. S. *et al.* Sêmen bovino sexado: A produção in vitro de embriões pode ser influenciada

pelo touro doador do material genético. **Revista de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 04-08, 2018. Disponível em: <https://editora.univassouras.edu.br/index.php/RS/article/view/1298> Doi: <https://doi.org/10.21727/rs.v9i1.1298>

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Potencial biotecnológico da sexagem espermática na produção animal. **Ciência Animal**, v. 29, n. 4, p. 101-111, 2019. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9786>

SINGH, D.; KUMAR, P.; NEHRA, K.; KUMAR, A. Sexed semen technology in cattle: A revolutionary technique in Indian dairy industry. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 6, p. 946-950, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337919029_Sexed_semen_technology_in_cattle_A_revolutionary_technique_in_Indian_dairy_i

VILLADIEGO, F. A. C.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; ÁLVAREZ, J. A. C. Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração. **Revista de Medicina Veterinária**, n. 36, p. 121-133, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322668818_Semen_sexado_atraves_de_citometria_de_fluxo_e_centrifugacao_por_gradiente_de_concentracao Doi:10.19052/mv.5178

VISHWANATH, R.; MORENO, J. F. Semen sexing—current state of the art with emphasis on bovine species. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s85-s96, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29552998/> Doi: 10.1017/S1751731118000496

YADAV, H. P.; SAHU, S. K.; LONE, S. A.; SHAH, N. Advances in sperm sexing in bovines. **Journal Experimental Zoology India**, v. 21, p. 1-9, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/329735822_ADVANCES_IN_SPERM_SEXING_IN_BOVINES

YATA, V. K.; Sperm Sexing Using Flow Cytometry: Principles and Applications. **Sperm Sexing and its Role in Livestock Production**, p. 51-64, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/360362572_Sperm_Sexing_Using_Flow_Cytometry_Principles_and_Applications Doi:10.1007/978-981-19-1790-5_4