

January 2018

## Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración

Faider Alberto Castaño Villadiego  
*Universidade Federal de Viçosa, faider\_cas@hotmail.com*

José Domingo Guimarães  
*Universidade Federal de Viçosa, jdguima@ufv.br*

Eduardo Paulino Da Costa  
*Universidade Federal de Viçosa, epcosta@ufv.br*

José Alberto Cardona Álvarez  
*Universidad de Córdoba, cardonalvarez@hotmail.com*

Víctor Henrique Gómez León  
*Universidade Federal de Viçosa, victorhgl8@gmail.com*

*See next page for additional authors*

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

---

### Citación recomendada

Castaño Villadiego FA, Guimarães JD, Da Costa EP, Cardona Álvarez JA, Gómez León VH y Ramírez López CJ. Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración. *Rev Med Vet.* 2018;(36): 121-133. doi: <https://doi.org/10.19052/mv.5178>

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

---

## Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración

### Autor

Faider Alberto Castaño Villadiego, José Domingo Guimarães, Eduardo Paulino Da Costa, José Alberto Cardona Álvarez, Víctor Henrique Gómez León, and Camilo José Ramírez López

# Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração

Faider Alberto Castaño Villadiego<sup>1</sup> / José Domingo Guimarães<sup>2</sup> / Eduardo Paulino Da Costa<sup>3</sup> / José Alberto Cardona Álvarez<sup>4</sup> / Víctor Henrique Gómez León<sup>5</sup> / Camilo José Ramírez López<sup>6</sup>

- 1 Medico Veterinário Zootecnista, MSc. (c) PhD. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Brasil.  
✉ E-mail: faider\_cas@hotmail.com
- 2 Medico Veterinario, MSc PhD. Orientador no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Brasil.  
✉ E-mail: jdguima@ufv.br
- 3 Medico Veterinário, MSc, PhD. Orientador no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Brasil.  
✉ E-mail: epcosta@ufv.br
- 4 Medico Veterinario Zootecnista, Esp. MSc, PhD. Professor de Medicina e Clínica de Grandes Animais. Universidad de Córdoba, Departamento de Ciências Pecuárias, Montería, Colômbia.  
✉ E-mail: cardonalvarez@hotmail.com
- 5 Medico Veterinario Zootecnista, MSc, (c)PhD. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Brasil.  
✉ E-mail: victorhgl8@gmail.com
- 6 Medico Veterinário Zootecnista, Pesquisador ligado ao Grupo de Investigação em Produção Animal Tropical "GIPAT". Universidad de Córdoba, Departamento de Ciências Pecuárias, Montería, Colômbia.  
✉ camilo2407@gmail.com

Cómo citar este artigo: Villadiego FA, Guimarães J, Da Costa E, Álvarez JA, León H, López CJ. Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração. Rev Med Vet. 2018;(36):121-133. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5178>

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi apresentar uma revisão completa e atualizada sobre a origem do sêmen sexuado, os requisitos e as técnicas de sexagem espermáticas. Nas últimas décadas, desenvolveram-se várias tecnologias na área da reprodução animal. O sêmen sexado é uma biotecnologia recente que ainda se encontra em fase de estudo e aperfeiçoamento em diversas etapas, devido a que o processo de sexagem causa estresse ao espermatozoide, e o deixa mais sensível ao processo de armazenamento; isto interfere diretamente na fertilidade. Esta tecnologia, que chegou ao Brasil em 2004, vem ganhando adeptos entre produtores que desejam produzir animais mais homogêneos para o sacrifício ou para a produção de leite. O uso do sêmen sexado tem sido difundido em muitos rebanhos do mundo, já que se apresenta como uma técnica com um direcionamento maior na seleção do sexo. Muitas técnicas têm sido utilizadas com a finalidade de buscar uma maior separação de espermatozoides portadores de cromossomas X e Y, com mínima agressão espermática. Desta forma, 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.

**Palavras chave:** bovinos, biotecnologia, sexagem espermática, cromossomas.

## Semen sexed using flow cytometry and concentration gradient centrifugation

### Abstract

This study aimed to present a complete and updated review on the origin of sexed semen, as well as on the requirements and techniques of sperm sexing. In the last decades, several technologies were developed in the field of animal reproduction. Sexed semen is a recent biotechnology that is still under study and refinement in various stages, because the sexing process causes stress to the sperm, leaving it more sensitive to the storage process; this directly interferes with fertility. This technology, which arrived in Brazil in 2004, has been gaining support among producers who want to produce more homogeneous animals for slaughter or for dairy production. The use of sexed semen has been disseminated in many herds of the world, since it is a technique with better results in the selection of sex. Many techniques have been used in order to seek a greater separation of sperms carrying X and Y chromosomes, with minimal sperm aggression. In this way, the use of sperm sexing has obtained results in the application of assisted reproductive bio-

technologies, which has increased the gain in genetic improvement and has optimized productivity in the chosen sex. In the meantime, there are still many limitations, mainly concerning exposure time, exploitation rate, and the results of pregnancy rates in field conditions. On the other hand, the dose of sexed semen can cost two to eight times the value of conventional semen; nevertheless, its use progresses in Brazil.

**Keywords:** cattle, biotechnology, sperm sexing, chromosomes.

## Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue presentar una revisión completa y actualizada sobre el origen del semen sexado, los requisitos y las técnicas de sexaje espermáticas. En las últimas décadas, se desarrollaron varias tecnologías en el área de la reproducción animal. El semen sexado es una biotecnología reciente que aún se encuentra en fase de estudio y perfeccionamiento en diversas etapas, debido a que el proceso de sexaje causa estrés al espermatozoide, y lo deja más sensible al proceso de almacenamiento; esto interfiere directamente en la fertilidad. Esta tecnología, que llegó a Brasil en 2004, viene ganando adeptos entre productores que desean producir animales más homogéneos para el sacrificio o para la producción lechera. El uso del semen sexado ha sido difundido en muchos rebaños del mundo, ya que se presenta como una técnica con un direccionamiento mayor en la selección del sexo. Muchas técnicas han sido utilizadas con el fin de buscar una mayor separación de espermatozoides portadores de cromosomas X y Y, con mínima agresión espermática. De esta forma, la utilización del sexaje espermático ha obtenido resultados en la aplicación de biotecnologías de la reproducción asistida, y con eso ha elevado la ganancia en el mejoramiento genético y ha optimizado la productividad en el sexo escogido. Entretanto, aún existen muchas limitaciones, principalmente referentes al tiempo de exposición, la tasa de aprovechamiento y los resultados de tazas de gestación en condiciones de campo. Por otro lado, la dosis de semen sexado puede costar de dos a ocho veces el valor de una convencional; así mismo, su uso avanza en Brasil.

**Palabras clave:** bovinos, biotecnología, cromosomas, sexaje espermático.

### INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente tem o maior rebanho comercial do mundo, sendo considerado um dos maiores produtores de carne bovina, com uma população média de 209 milhões de animais, obtendo-se desse rebanho um contingente de vacas e novilhas de 74 milhões em fase reprodutiva. Diante disso, com os avanços da genética e busca de desejáveis progressos na produtividade, a biotecnologia de sexagem tem sido otimizada e estudada, com o intuito de produzir mais com menor custo (1).

Com isso, pode-se notar que o sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o desempenho do agronegócio, principalmente quando direciona-se para a produção leiteira, onde o bezerro macho tem pouco ou quase nenhum valor. Em contrapartida o bezerro macho, na bovinocultura de corte tem um valor econômico mais interessante pelo seu potencial produtivo.

Dessa forma, o uso do sêmen sexado (SS), tem evoluído em pesquisas, principalmente em escalas comerciais. Com a evolução das técnicas de sexagem, percebeu-se

que espermatozoides machos (com cromossomo Y) tem diferença em 4% de DNA das células espermáticas de fêmeas (espermatozóide X possui cerca de 4% mais material genético que espermatozóide Y), além disso, a forma e a área da cabeça dos espermatozoides dos bovinos facilitam a sua separação por meio de citometria de fluxo CF (2). Diante desses dados, Lima (3) complementa a idéia de que para o uso comercial da sexagem de espermatozoides deve-se haver uma metodologia que seja compatível com o processo de congelamento, reduzindo a perda de espermatozoides e fazendo com que não haja comprometimento do poder fecundante dos mesmos.

A partir desses estudos na evolução de um modelo que seja eficiente no seu processo de sexagem espermática, descobriram-se técnicas avançadas como a CF e a centrifugação por gradiente de densidade, que tem levado a alguns resultados diante da aplicação comercial. Desta forma, essas técnicas têm sido estudadas com maior clareza e objetividade com o intuito de diminuir a agressão ao espermatozóide em etapas de manipulação e classificação, exposições a laser e corantes, fazendo com que este se torne capacitado para fecundar o óvulo e resulte em boa acuidade na separação dos espermatozoides X e Y.

Recentes avanços na forma da ponteira do CF, no posicionamento das células espermáticas no momento da passagem pelo laser, assim como modificações na pressão e no tipo de coloração das células, melhoraram significativamente o processo de separação dos gametas X e Y (4). Deste modo, a revisão teve como objetivo apresentar a origem do sêmen sexado, requisitos e técnicas de sexagem espermática.

## HISTÓRICO DA SEXAGEM ESPERMÁTICA

Segundo Johnson e Welch (5), os primeiros estudos realizados procurando separar as duas populações de espermatozoides remontam à década de 20, quando foi tentado, sem sucesso, a separação dos dois tipos celulares recorrendo à centrifugação de sêmen. Em meados do século XX, foram realizados vários estudos na área

de ciências biológicas, com foco no melhoramento genético. Desse modo, descobriram e identificaram os cromossomos sexuais e consideraram os espermatozoides iguais em suas características (4), devido a pequenas diferenças não significativas entre os espermatozoides que carregavam o cromossomo X ou o Y como tamanho, peso, densidade, velocidade, cargas elétricas de superfície, proteínas macromoleculares de superfície, efeitos de pH e pressão atmosférica (6). O sexo é determinado em mamíferos, através da informação cromossômica (X ou Y) transportada pelo espermatozóide. A sexagem destes proporcionou avanço nas técnicas que buscam produzir uma prole de um determinado sexo (4).

As primeiras espécies estudadas com intuito de pré-seleção sexual com base em separação de espermatozoides foram coelhos e suínos, em que foi utilizado o método da centrifugação por gradiente de densidade num meio composto de plasma seminal e líquido vaginal purificado de coelhos. Porém, essa pesquisa não demonstrou ser método prático para controlar a relação do sexo entre os descendentes dos animais em experimentação (7).

O intuito da aplicação comercial de sexagem de espermatozoides varia de acordo com a metodologia utilizada e a compatibilidade do processo de congelamento, a fim de causar perdas mínimas de espermatozoides durante o processo e não provocar a redução do poder fecundante dos mesmos (3).

Por tanto, a utilização de diferentes maneiras de sexagem faz com que os espermatozoides e o DNA destes sofram danos irreversíveis, comprometendo a eficiência no processo de fertilização e produção de embriões (8). Dessa forma, há uma preocupação com os danos causados aos espermatozoides devido à manipulação excessiva, uso de corantes e posterior incubação, além de alterações advindas dos processos de classificação e centrifugação, levando com esses fatores a uma diminuição das taxas de gestação, que terminam sendo menores, em geral, quando do uso da inseminação artificial (IA) com SS em relação à inseminação artificial com sêmen convencional SC (8).

## VANTAGENS E DESVANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DO SÊMEN SEXADO

Em estudos comparando o SS com o SC, demonstrou-se que o primeiro tem obtido resultados de taxa de prenhez inferiores ao último. Justifica-se a queda da fertilidade do SS devido à redução da viabilidade espermática produto dos processos da sexagem, a criopreservação no nitrogênio líquido e a baixa concentração espermática na dose inseminante em relação ao sêmen não sexado. Desta forma, diante da disponibilização de sêmen de empresas deste ramo, cabe ao produtor avaliar o custo benefício dessa tecnologia (6). A necessidade de pré-determinar o sexo dos bezerros é de interesse de muitos produtores de leite, visto que se necessita de novilhas de reposição em seus próprios rebanhos, assim como a valorização três vezes maior em dinheiro de novilhas leiteiras quando comparadas aos filhotes machos (9).

O emprego da biotecnologia de sexagem de sêmen otimizou a produtividade, permitindo um avanço genético rápido com a seleção de animais com sexo desejado, adquirindo uma produção maior com menor custo (1). Na produção de bovinos tem-se avaliado o potencial desta técnica, devido a fatores limitantes à sua aplicação como o custo extra da dose de SS, a variação na fertilidade do SS em relação ao SC e a precisão da definição do sexo do produto (10).

Na pecuária de leite e corte, o valor econômico da seleção de sexo é de grande importância, o que faz a produtividade de um sistema ser favorecido pela progênie de um dos sexos. Devido a isso, em programas de melhoramento genético animal houve um aprimoramento e difusão de biotecnologias de reprodução, aumento da eficiência dos sistemas de produção, o que beneficiou o surgimento das técnicas de seleção de sexo baseada na separação de espermatozoides portadores de cromossomos X e Y e embriões pré-implantados, em espécies de interesse zootécnico (11).

Existem várias vantagens para o uso do SS na produção de bovinos, mas observam-se limitações as quais restringem a utilização desta tecnologia. Segundo Seidel e

Schenk (12), citados por Dalton (13), a diminuição nas taxas de concepção quando a inseminação é feita com SS pode se dever a lesão ao espermatozoide durante o processo de coloração antes da CF; exposição do espermatozoide ao raio laser forte durante a separação e centrifugação para concentrar os espermatozoides antes da colocação nas palhetas.

Para Mocé et al. (14), a redução na fertilidade com uso do SS se deve ao fato de que ainda não se consegue saber se a amostra de sêmen de um touro é capaz de resistir ao processo de sexagem e ainda manter uma fertilidade aceitável antes de se fazer a separação, congelamento e descongelamento e, que no uso da técnica de CF ocorrem alterações na membrana espermática que aceleram o processo de reação acrossômica no espermatozoide após a criopreservação (pré-capacitação), acarretando em uma diminuição da sobrevivência do espermatozoide sexado no genital da fêmea.

Mocé et al. (14), encontraram que para minimizar os problemas de aceleração da capacitação e reação acrossomal, deve-se realizar mudanças no processo de sexagem e no processo de congelamento, o que pode resultar em aumento da fertilidade do SS. Dentre essas mudanças, existe o efeito da alta diluição, osmolaridade dos tampões, temperaturas de coloração e separação, efeitos de intensidade do laser, tempo e força de centrifugação para concentrar espermatozoides sexados, diluente de congelamento, taxa de refrigeração, intervalo entre refrigeração e criopreservação (15).

Através da utilização da criopreservação, tem-se um aumento na utilização do sêmen à longa distância, maximizando assim sua aplicação em outras biotécnicas da reprodução. Assim, a partir do uso da técnica utilizada para separação espermática, a criopreservação necessita de mudanças nos protocolos usados para IA com o intuito de maximizar a viabilidade do sêmen aumentando a taxa de prenhez. Como solução para aumentar a taxa de prenhez, deve-se utilizar o sêmen sexado o mais próximo o possível do local de fertilização, assim como no momento mais próximo possível da ovulação (14).

Dessa forma, várias técnicas de sexagem continuam a ser testadas, entretanto nenhuma ainda conseguiu reunir os dois critérios essenciais: sexagem com precisão e manutenção da fertilidade dos espermatozóides (16).

Para a utilização em larga escala de SS torna-se claro que ainda existem alguns detalhes que precisam ser aperfeiçoados na técnica como: tempo de separação, viabilidade e número de espermatozóides por dose inseminante, diluidores específicos para permitir o transporte e preservação do SS, além do custo da dose inseminante (17).

## CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO SÊMEN SEXADO CRIOPRESERVADO

As características estruturais do espermatozóide estão voltadas para o sucesso da concepção. Para que uma célula espermática seja considerada qualitativamente viável e potencialmente fértil, é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais, ademais de DNA intactos (18). Freitas (19), realizou avaliação morfológica do SS após a criopreservação, pela técnica de epifluorescência, onde foram utilizadas associações dos corantes Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (para demarcar as células com ruptura de membrana) e sondas fluorescentes, e verificou a integridade de membrana plasmática, acrossomal e a função mitocondrial (Figura 1).

Quando o sêmen é depositado no útero, ocorrem modificações na célula espermática (20), que induz a reação acrossômica e hiperativação do espermatozóide, possibilitando sua entrada no ovócito (21).

A base molecular do processo de capacitação espermática é a remoção de colesterol e alteração da distribuição dos fosfolípidios de membrana que resultam na abertura dos canais de  $Ca^{++}$ . Modificações semelhantes podem acontecer na crioinjúria levando à ocorrência de uma capacitação espermática antecipada, o que não é desejável por diminuir a longevidade do espermatozóide. Logo, o alto potencial de membrana mitocondrial encontrado no sêmen de animais tratados com o diluente TRIS pa-

receu indicar que estes espermatozóides podem ter iniciado a capacitação espermática prematura (19).

No trabalho desenvolvido por Mocé et al. (14), verificou-se que o processo de sexagem induz mudanças na membrana do sêmen o que acelera o processo da capacitação e da reação acrossômica dos espermatozóides após a criopreservação.

Avaliando os índices de prenhez, quando utilizadas doses na mesma concentração para os SS e não-sexado, fresco e congelado, a fertilidade do SS foi inferior ao SC em várias espécies (22), indicando que danos devido à sexagem também foram expressos com baixas taxas de prenhez (23). Do mesmo modo, altas percentagens de degeneração embrionárias foram observadas em novilhas superovuladas quando foi realizada a inseminação com SS (53%), comparado com o SC (24%) (24).

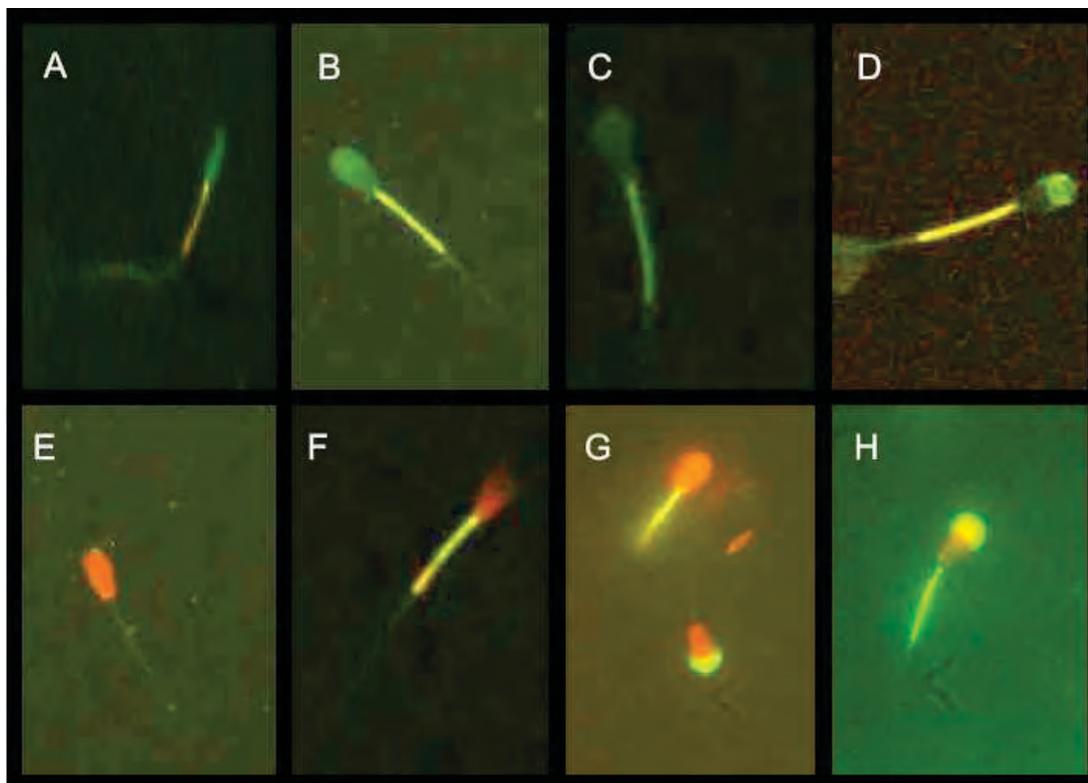
## PRODUÇÃO LEITEIRA

Na pecuária de leite a qual têm como característica ter raças especializadas, a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino são um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção (25).

De maneira geral, segundo Maillard et al. (26), o objetivo da sexagem de espermatozóides é evitar o desperdício de animais. Trata-se principalmente na atividade leiteira, de evitar o nascimento de machos, que são sacrificados, representando custos econômicos e éticos. A cada ano, a eutanásia de 600 mil bezerros machos recém-nascidos custa o equivalente a 42 milhões de euros para os pecuaristas britânicos.

As vacas de maior potencial genético poderiam ser inseminadas com sêmen X, de maneira que pudessem produzir fêmeas para a renovação de plantel, enquanto as outras seriam inseminadas com sêmen não triado, mais barato, ou com sêmen Y de raça de corte (tudo dependerá do custo da palheta do sêmen sexada, da existência de bom mercado para a venda de machos cruzados, e etc.) (26).

Figura 1. Integridade das membranas e função mitocondrial dos espermatozoides após serem corados



*Nota.* Os espermatozoides identificados em A e B representam células espermáticas com membrana celular e acrossomal íntegras com alta função mitocondrial. C representa célula com membranas plasmática e acrossomal intacta com baixa função mitocondrial. D representa célula com membrana celular intacta, membrana acrossomal lesada e alta função mitocondrial. E representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e baixa função mitocondrial. F representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial. G representa célula com membrana celular lesada, membrana acrossomal intacta e alta função mitocondrial (superior), célula com membrana celular e acrossomal lesadas com baixa função mitocondrial. H representa célula com membranas celular e acrossomal lesadas e alta função mitocondrial. Sendo observada diversas situações dos espermatozoides sexados após a criopreservação (19).

Entretanto, según Weigel (27), os países que utilizam doses de SS em seus rebanhos leiteiros essas estimativas não têm se concretizado devido a dois fatores, primeiro, a sexagem por CF, que é a técnica disponível comercialmente, atende apenas 0,5% da demanda diária de doses do mercado; é segundo, a taxa de prenhez a campo está em torno de 20-40% e 55-60% utilizando SS e SC, respectivamente.

Nos Estados Unidos, resultados de um teste de campo compararam as taxas de prenhez, conseguidas com es-

permatozoides sexados por CF, em rebanhos com baixa, média e alta eficiência reprodutiva. A taxa média de prenhez utilizando doses de SC foi de 58%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozoides sexados nesses rebanhos as taxas de gestação foram 21%, 37% e 35%, respectivamente.

Por sua parte, na Finlândia, outro teste de campo comparou as taxas de prenhez conseguidas com espermatozoides sexados por CF (foram utilizadas 157 doses) e com SC (foram utilizadas 149 doses). A taxa média

de prenhez utilizando doses de SC foi de 46%, enquanto que utilizando sêmen com espermatozoides sexados nesses rebanhos a taxa de gestação foi 21%, respectivamente. Assim nasceram mais bezerras após a IA com SC (33 bezerras) do que como SS (27 bezerras) (28).

Considerando esses resultados, tornase evidente que os espermatozoides sexados por CF comprometem a taxa de prenhez, pelo menos atualmente, e estratégias para a aplicação comercial *in vivo* desse sêmen deveriam ter como foco caminhos para se obter benefício efetivo incluindo idade a primeira parição, frente ao custo de utilização (27).

## REQUISITOS DA TÉCNICA DE SEXAGEM ESPERMÁTICA

A tentativa de separar espermatozoides bovinos em frações de espermatozoides portadores de cromossomo sexual X e portadores do cromossomo sexual Y tem sido estudo de inúmeros cientistas de reprodução durante décadas (11). Em busca de uma técnica eficiente de separação espermática, Batista et al. (29) definiu os seguintes requisitos, que seja inofensiva às funções dos espermatozoides; ser eficiente, todas ou a maioria das células devem ser sexadas e com reduzido descarte e perda de espermatozoides durante o processo deve ser o menor possível; tenha acuidade próxima de 100%; seja reproduzível; ser simples e rápida, ou seja, permita avaliar alto

número de amostras em pouco tempo; e que seja barata o suficiente para se difundir 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 na prática.

## Métodos de sexagem espermática

As diferenças fenotípicas tem sido alvo de estudo como: sensibilidade ao pH, carga elétrica de superfície de membrana espermática, morfologia do núcleo e cabeça, antígenos de superfície, velocidade de migração, gradiente de centrifugação e diferenças no conteúdo de DNA (30-39).

Considerando-se que o espermatozoide X contém 4% mais DNA que o espermatozoide Y, existe a possibilidade de medição do conteúdo de DNA de cada espermatozoide, diferenciando-os em X e Y (16). Baseado nisso, existem duas técnicas que podem ser utilizadas para selecionar o sexo de espermatozoides: centrifugação em gradiente de densidade e CF (3).

## Métodos de sexagem espermática baseados nas diferenças físicas

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

Tabela 1. Técnica baseada em diferenças físicas

Técnica usada	Diferença física explorada nos espermatozoides
Diferença no pH	Sensibilidade ao pH
Corante de feulgen e microscopia ótica	Tamanho e morfologia da cabeça
Electroforese	Carga elétrica
Diferença na velocidade de migração	Motilidade progressiva (velocidade de migração)
Diferença de massa	Massa (por diferente conteúdo de DNA)
Fluorocitometria de fluxo	Tamanho (por diferente conteúdo de DNA)

Fonte: adaptado de Pegoraro LM, Hossepian VF. Selección del sexo em mamíferos. En: Biotecnología de la reproducción. Buenos Aires: Reprobiotec; 2001. p. 317-351.

## Centrifugação em gradiente de densidade

O objetivo da utilização da técnica de centrifugação em gradiente de densidade baseia-se na diferença de densidade entre os cromossomos X e Y (3). Summer e Robinson (40), através da técnica de microinterferometria, analisaram a cabeça dos espermatozóides e observaram uma variação de conteúdo de DNA e proteína nuclear do cromossomo X em relação ao Y, verificando assim uma diferença de peso e densidade entre os tipos celulares. Para isso, há a necessidade de se desenvolver gradientes eficientes com menor grau de dificuldade e em menor tempo como o gradiente de densidade. Dessa forma, existem dois tipos:

a) *Gradientes de densidade*: quando há um aumento gradual da densidade da parte superior do gradiente até a parte inferior, não havendo delimitação entre as camadas formadas previamente, formando um gradiente linear.

b) *Gradientes de densidade descontínuos*: também há um aumento gradual da densidade da parte superior para a inferior, contudo este tipo possui camadas definidas, e a depender das concentrações utilizadas, é possível a visualização dessas camadas (41).

Shastri et al. (42), ao utilizar o gradiente de Ficoll, observaram que dos espermatozóides encontrados no sedimento, 73% a 77% possuíam cromossomo sexual Y e 75-80% dos espermatozóides que permaneceram na interface possuíam cromossomo sexual X. Entretanto, Ilzuka et al. (43) e Schwiderski et al. (44), ao utilizarem o gradiente de Percoll, considerado com maior nível de resolução de densidade, observaram as células de maior massa (espermatozóides X) sedimentados com mais rapidez.

Schwiderski et al. (44) usaram do gradiente de Percoll para separar espermatozóides bovinos portadores de cromossomos X e Y. Este obteve uma separação de quatro frações na suspensão de espermatozóides, sendo que a primeira e última foram retiradas, misturadas e colocadas para centrifugar novamente. Após isso, observou-se um enriquecimento de mais de 75% de espermatozóides X ou Y nas frações superior e inferior,

respectivamente, e não apresentaram diferenças significativas quanto a morfologia e reação acrossômica. Além disso, obteve-se 75% e 92% de embriões do sexo masculino e feminino, respectivamente, nas inseminações realizadas.

Segundo Lima (3), para se promover uma resistência maior ao processo de congelamento, as alterações causadas pelo processo de centrifugação e separação podem ser minimizadas diminuindo o número de centrifugações, visto que isso não se alteraria a acuidade da separação de espermatozóides X e Y.

## Citometria de fluxo

Nos últimos anos, uma técnica desenvolvida pelo Laboratório de Livermore, denominada sexagem espermática por quantificação do DNA usando a CF, foi utilizada em maior frequência (45). No final da década de 60, utilizou-se o CF com o intuito de acelerar a mensuração do DNA das células através de várias propostas, inclusive estudos com câncer. Na reprodução, utilizou-se esse método para avaliar alterações espermáticas frente a danos genéticos (5).

A CF tem custo elevado e de utilização restrita, pois gasta aproximadamente 30 minutos para sexar 1 dose de sêmen, não sendo até o momento viável sua utilização comercial. A utilização da CF para produção do SS bovino tem mostrado eficiência 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, assim como ganhos genéticos com redução no tempo na seleção de plantéis, desconsiderando a análise do custo econômico desse sêmen frente à finalidade para qual será utilizado (46).

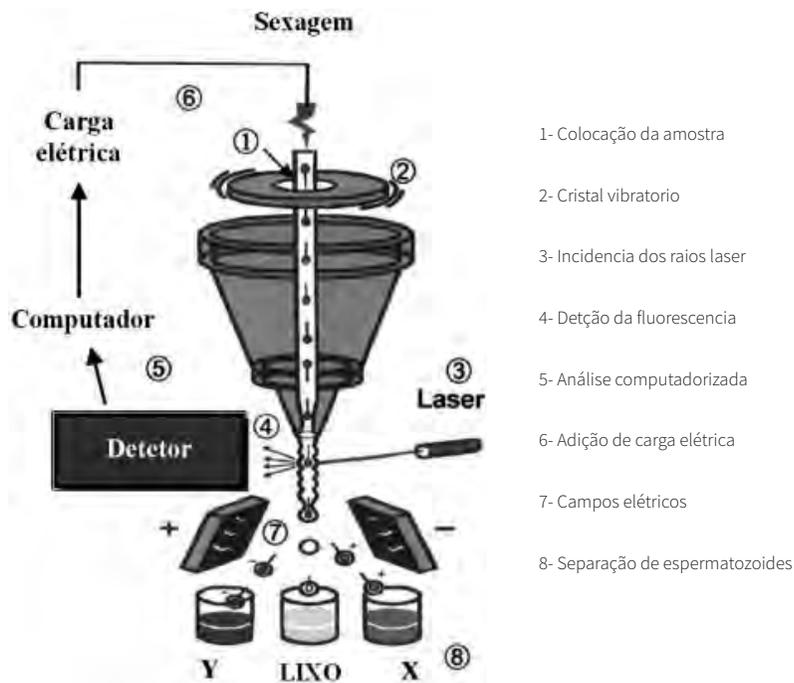
A capacidade de pré-selecionar o sexo da prole de animais importantes para o desenvolvimento da produção animal tem um impacto de grande importância para a economia. A principal diferença entre espermatozóides X e Y advém da quantidade de DNA dos mesmos.

Assim, através de estudos com chinchilas e ratos silvestres, a técnica de CF foi utilizada para medir informações nos cromossomos dos espermatozoides X e Y e determinar a razão sexual da prole nascida (4).

A utilização do método possibilitou a mensuração da quantidade individual de DNA de cada célula espermática pela fluorescência emitida por um corante

(Hoechst 33342) que se liga ao DNA. Devido a uma diferença na quantidade de DNA, os espermatozoides X, após serem expostos a esse corante fluorescente, apresentam um brilho maior do que os espermatozoides Y. Após isso, os espermatozoides passam numa fila única que contém um separador com campo elétrico e são direcionados para um tubo de coleta a partir da diferença de cargas elétricas positivas ou negativas (13) (figura 2).

Figura 2. Esquema do processo da sexagem do espermatozóide pelo citômetro de fluxo



Fonte: Garner D. Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. J Androl. 2001;22(4):519-26.

A velocidade de separação dos espermatozoides X e Y é relativamente lenta — aproximadamente 3000 a 4000 células por minuto para cada sexo. Os espermatozoides são conduzidos através do aparelho em velocidades que se aproximam aos 90 km/h e a pressão de 50 psi ao deixar o “nozzle”. Esta alta pressão e suas seqüelas comprometeriam a viabilidade e a motilidade do espermatozóide, deste modo, reduzindo a fertilidade (47). 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 espermatozoides carreadores do cromossomo X ou Y (48,49).

Através da separação dos espermatozoides pela CF, pôde se observar a efetividade do processo, alcançando uma pureza de 90% do sexo desejado (5,50).

Segundo Oses (51), um resultado satisfatório na CF, para separação de duas populações de espermatozoides, depende de uma boa qualidade e concentração espermática, correlacionado com boas percentagens de motilidade espermática no ejaculado. Com o intuito da produção de SS criopreservado, as células espermáticas são expostas a processos físicos e químicos: diluição, incubação, coloração, passagem pelo CF, exposição a laser, pressão, centrifugação e criopreservação (52), o que pode afetar a capacidade de sobrevivência e potencial de fertilização dos espermatozoides (11).

Na utilização da sexagem pela técnica de CF 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 espermatozoides normais, além de avaliação morfométrica e da estrutura da cromatina dos espermatozoides (11).

Estudos realizados por Zhang *et al.* (53), mostraram que até o desenvolvimento embrionário do estágio de blastocisto não houve mudança quanto ao processo de separação por CF e coloração de DNA, entretanto as variações entre touros ao processo de sexagem foram observadas para taxa de clivagem e formação de blastocisto.

Segundo Garner (23), apesar do uso do SS com baixa quantidade de espermatozoides e com diminuição da viabilidade espermática pós sexagem, a CF, tem sido empregado em diversos estudos, principalmente por a acuidade da sexagem pode chegar a atingir 95%. Entretanto, como toda nova técnica, o processo de sexagem por CF ainda tem limitações, devido à técnica utilizar um longo tempo para produzir uma quantidade suficiente de espermatozoides (54) o que encarece o processo, tornando-os com baixa longevidade de espermatozoides frescos e criopreservados (14).

### **Técnica de sexagem por citometria de fluxo vs. gradiente de percoll**

A utilização comercial do SS na reprodução de bovinos é uma realidade, apesar de muitos estudos relatarem

menor fertilidade do mesmo quando comparado ao não sexado, tanto *in vivo* como *in vitro* (55,56). A técnica de sexagem por CF pode gerar alguns danos aos espermatozoides, provavelmente em razão da exposição ao laser, da grande pressão na passagem pelo citômetro, da queda em grande velocidade dentro do tubo de colheita e da permanência durante algumas horas em temperatura ambiente antes do processamento (57).

Entre as características espermáticas afetadas pelo processo de sexagem, a diminuição da motilidade tem sido relatada por diversos autores (22,58). A motilidade é um importante fator a ser considerado na análise da qualidade espermática, e constitui um dos melhores parâmetros para se prever a fertilidade de uma amostra de sêmen (59,60).

Além das doses comerciais de SS apresentarem concentrações espermáticas inferiores ao convencional, o padrão alterado de movimentação espermática resultado da separação por CT derivam em dificuldade de sedimentação dos espermatozoides após a seleção por *Percoll* nos processos de produção *in vitro* de embriões, portanto, o número de células recuperadas é menor, resultando em uma concentração inadequada e conseqüentemente, restringindo a quantidade de oócitos que poderiam ser fecundados. A baixa concentração espermática obtida após seleção em gradiente *Percoll* está relacionada com taxas mais baixas de clivagem e conseqüentemente, taxas inferiores de produção de blastocistos, comparando a produção com SC ou não sexado (61).

## **CONCLUSÕES**

O sêmen sexado tem demonstrado efetividade no seu uso desde que seja manipulado de forma organizada e correta, com pessoal capacitado e depositado no momento mais próximo da ovulação para garantir uma fertilização mais eficiente. Mostra-se que as técnicas de sexagem têm evoluído nos seus testes, tanto na acuidade na separação espermática como no processo de pureza. Assim, diversos aspectos relacionados à técnica de sexagem de células espermáticas viáveis ainda necessitam

ser elucidados, como redução dos custos associada ao aumento da produção destas células com alto poder fecundante, a variação individual na fertilidade dos reprodutores doadores de sêmen para a sexagem e aspectos técnicos como a exposição à centrifugação, corantes e raios laser, de forma a diminuir esse avanço na capacitação e reação acrossômica do espermatozóide sexado.

## REFERÊNCIAS

1. Medalha, A.G. Sêmen sexado [tese de mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.
2. Baruselli OS, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Sales JN, Ayres H, et al. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007;31(3):374-81.
3. Lima VF. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? *Acta Sci Vet.* 2006;34(Suppl 1):213-24.
4. Garner DL, Seidel GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology.* 2008;69(7):886-95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006>
5. Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometry sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.* 1999;52(8):1323-41. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00220-4)
6. Seidel GE. Sexing mammalian sperm and embryos – State of the art. *J Reprod Fertil.* 1999;(Suppl 54):475-85.
7. Lush JL. The possibility of sex control by artificial insemination with centrifuged spermatozoa. *J Ag Res.* 1925;30:893-913.
8. Moreira JS, Costa DS. Uso de sêmen sexado para produção de touros Nelore no Estado de Mato Grosso do Sul. Mato Grosso do Sul [internet]: Campo Grande: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009 [citado 2015 ago 06]. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=542>.
9. Wheeler MB, Rutledge JJ, Brown AF, Vanetten T, Malusky D, Beebe DJ. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology.* 2006;65(1):219-27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.032>
10. Neves HH, Carvalheiro R, Fries LA, Queiroz SA. Uso combinado de sêmen sexado e acasalamento dirigido sobre uma população de bovinos de corte submetida a seleção: estudo de simulação. *R Bras Zootec.* 2009;38(12):2368-74. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001200011>
11. Oliveira KM. Efeito do processo de sexagem de sêmen por citometria de fluxo e criopreservação sobre morfometria da cabeça de espermatozoides e estabilidade de cromatina [tese de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2007.
12. Seidel GE, Schenk JL. Sex-selected semen. Em: *Proceedings applied reproductive strategies in beef cattle, Nebraska.* Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln; 2006. p. 261-267.
13. Dalton JC. Oportunidades e desafios do sêmen sexado. Em: *Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos 14, Uberlândia.* Anais. Uberlândia: FMVZ, UNESP; 2010.
14. Mocé E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology.* 2006;66(4):929-36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.063>
15. Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel JR. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 1999;52(8):1375-91. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00224-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00224-1)
16. Seidel GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 2007;68(3):443-46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.005>
17. Rumpf R, Dode MA, Silva FA. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. Em: *Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Viçosa.* Anais. Viçosa: DZO, UFV, 2000.
18. Arruda R, Celeghini E, Alonso M, Carvalho H, Oliveira L, Nascimento J. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011;35(2):145-51.
19. Freitas CP, Dell'Aqua JA, Crespilho AM, Papa FO, Landim-Alvarenga FC. Variações metodológicas na

- criopreservação de sêmen sexado de bovinos. *Vet e Zootec.* 2011;18(1):147-55.
20. Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;63(2):352-62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.044>
  21. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 2000;10(3):197-235. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)
  22. Hollinshead F, O'Brien J, Maxwell W, Evans G. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 2002;14(8):503-8. <https://doi.org/10.1071/RD02034>
  23. Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology.* 2006;65(5):943-57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.009>
  24. Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL. et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod.* 2004;1(1):86-90.
  25. Hossepian VM. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Rev Bras Zootec.* 2004; 36(Suppl):219-28.
  26. Chastant-Maillard S; Druart X. Sexage des spermatozoïde chez les bovins. *Le Point Vétérinaire.* 2004; 247.
  27. Weigel KA. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *J Dai Sci.* 2004;87(E. Suppl):120-30.
  28. Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod Dom Anim.* 2006;41(2):95-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00625.x>
  29. Batista AM, Silva AR, Silva SV, Guerra MM. Sexagem de sêmen. *Ciênc Vet Tro.* 2008;11(2-3):49-56.
  30. Emmens CW. Insemination pH and sex ratio in rabbits. *J Hered.* 1960;51(2):156-7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106976>
  31. Gordon MJ. Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1957;43(10):913-918. <https://doi.org/10.1073/pnas.43.10.913>
  32. Kaneco S, Oshio S, Kobayashi T, Tizuka R, Mohri H. Human X and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;124(3):950-5. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91050-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91050-7)
  33. Shettles LB. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. *Fertil Steril.* 1961;12(6):502-8. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)34321-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)34321-7)
  34. Wachtel SS. H-Y antigen and biology of sex determination. New York: Grune and Stratton; 1983.
  35. Ericsson RJ, Langerrin C, Nishirro M. Isolation of fraction rich in human Y sperm. *Nature.* 1973;246:421-4. <https://doi.org/10.1038/246421a0>
  36. Zavos PM. Preconception determination via intravaginal administration of HY antisera in rabbits. *Theriogenology.* 1983;20(2):235-40. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90219-4)
  37. Hossepian VF. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1998.
  38. Johnson L, Clark RN. Sperm DNA and sex chromosome differences between to geographical populations of the creeping vole. *Mol Reprod Dev.* 1990;27(2):159-62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080270211>
  39. Johnson LA. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J Anim Sci.* 1992;70(Suppl. 2):8-18. [https://doi.org/10.2527/1992.70suppl\\_28x](https://doi.org/10.2527/1992.70suppl_28x)
  40. Summer AT, Robinson JA. A difference in mass between the heads of X and Y bearing human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1976;48:9-15. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0480009>
  41. Resende MV. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de percoll e optiprep [tese de doutoramento]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2007.

42. Shastry P, Hegde U, Rao S. Use of ficoll sodium methylcellulose density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature*. 1977;269:58-60. <https://doi.org/10.1038/269058a0>
43. Iizuka R, Kaneko S, Aoki R. Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient and its clinical application. *Hum Reprod*. 1987;7(2):573-5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136591>
44. Schwiderski H, Biottner S, Schwcrin M, Aim H, Duschinski U. Mikroinjektion um "in vitro" befruchtung mit spermien aus versuchen zur anreicherung der geschlechtsspezifischen spermientypen beim rind. *Reprod Domest Anim*. 1991;26(3):143-4. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1991.tb01531.x>
45. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*. 2002;80(1):1-10. [https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl\\_21a](https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a)
46. Meirelles C, Faria VR, Souza AB, Weiss R, Segui MS, Kozicki KE. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: Aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. *Arch Vet Sci*. 2008;13(2):98-103. <https://doi.org/10.5380/avs.v13i2.12888>
47. Suh TK, Schenk JL, Seidel GE. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*. 2005;64(5):1035-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.002>
48. Suh TK, Schenk JK. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology*. 2003;59:516.
49. Campos-Chillon LF, De La Torre JF. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of in vitro produced embryos. *Theriogenology*. 2003;59:506.
50. Seidel GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*. 2003;59(2):585-98. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01242-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01242-6)
51. Oses MV, Teruel MT, Cabodevila JA. Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Rev Vet*. 2009;20(2):138-45.
52. Krzyzosiak J, Evenson D, Pitt C, Jost L, Molam P, Vishwanath R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reprod Fert Develop*. 2000;12(5-6):251-61. <https://doi.org/10.1071/RD00081>
53. Zhang M, Lu KH, Seidel GE. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*. 2003;60(9):1657-63. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00177-8)
54. Garner D. Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *J Androl*. 2001;22(4):519-26.
55. Bodmer M, Janett F, Hassig M, Den Dass N, Reichner P, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*. 2005;64(7):1647-55. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.011>
56. Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutiérrez-Adán. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiol Genom*. 2008;32(2):264-272. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00234.2007>
57. Chastant-Maillard S, Druat X. 2005. Sexagem de espermatozóide bovino. *A Hora Veterinária*. 2005; 143: 43-48.
58. Blondin P, Beaulie M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*. 2009;71(1):30-8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.017>
59. Januskauskas A, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*. 2000;53(4):859-75. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00235-1)
60. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):23-37.
61. Dell'aqua JA, Papa FO, Araújo JP, Freitas CP, Ponchiroli CB, Figueiredo A S, et al. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. *Acta Sci Vet*. 2006;34(Suppl.):205-12.