

## CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE: ALTERNATIVA PARA SEXAGEM ESPERMÁTICA EM CÃES?

Gabriele Barros Mothé<sup>1</sup>  
Caroline Scott<sup>2</sup>  
Fabiana Ferreira de Souza<sup>3</sup>

### RESUMO

A evolução das técnicas de sexagem espermática nos últimos anos permitiu avanços significativos, mas ainda nenhum método foi empregado com sucesso na espécie canina. Apesar da citometria de fluxo ser um método eficiente para sexagem espermática, nos cães pode ser considerada de difícil aplicação, em vista do alto custo da aplicação da técnica e da baixa recuperação espermática após a separação. Em contrapartida, a centrifugação em gradiente de densidade também pode ser utilizada para separação espermática em cães. Essa técnica também se baseia na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. A separação espermática pode ser confirmada por diferentes métodos, como citometria de fluxo, hibridização *in situ* fluorescente (FISH), coloração com quinacrina mostarda e PCR. Objetivou-se, com esta revisão abordar a centrifugação em gradiente de densidade como uma alternativa a sexagem espermática em cães.

**Palavras-chave:** Cão, centrifugação, cromossomos X e Y, sêmen sexado, separação espermática.

### DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION: ALTERNATIVE FOR SEXING SPERM IN DOGS?

#### ABSTRACT

The technical progress concerning sperm sexing in recent years has enabled significant advances, but still none method was used successfully in dogs. Despite the flow cytometry to be an effective method for sperm sexing, in dogs it can be considered difficult to implement in view of high cost of application of the technique and low sperm recovery after separation. In contrast, density gradient centrifugation can also be used for separating sperm in dogs. This technique is also based on the DNA content difference between sperm with chromosomes X and Y. Sperm separation can be confirmed by various methods such as flow cytometry, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining with quinacrine mustard and PCR. The objective of this review to address the density gradient centrifugation as an alternative to sperm sexing in dogs.

**Keywords:** Dog, centrifugation, chromosomes X and Y, sexed semen, sperm separation.

<sup>1</sup> Discente de Pós-Graduação no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

<sup>2</sup> Discente do Programa de Doutorado no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP-Botucatu.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu.

## CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD: ALTERNATIVA PARA SEXAR ESPERMATOZOIDES CANINOS

### RESUMEN

El evolución de técnicas para la separación del sexo de espermatozoides en los últimos años ha permitido avances significativos, pero todavía no hay método que ha sido utilizado con éxito en los perros. A pesar de la citometría de flujo ser un método eficaz para el sexado de espermatozoides, en perros puede ser considerado difícil de implementar en vista del alto costo de la aplicación de técnica y la recuperación baja de espermatozoides después de la separación. En contraste, la centrifugación en gradiente de densidad también puede ser utilizado para la separación de espermatozoides en los perros. Esta técnica también se basa en la diferencia de contenido en DNA entre los espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y. Separación de espermatozoides puede ser confirmada por diversos métodos tales como citometría de flujo, hibridación in situ fluorescente (FISH), coloración con quinacrina mostaza y PCR. El objetivo de esta revisión es abordar el centrifugación en gradiente de densidad como alternativa a la separación del sexo de espermatozoides en los perros.

**Palabras clave:** Perro, centrifugación, cromosomas X e Y, semen sexado, separación de espermatozoides.

### INTRODUÇÃO

O interesse pelas biotecnologias reprodutivas na medicina veterinária tem crescido substancialmente. Dentre estas, a sexagem espermática tem grande destaque na produção animal. Apesar disso, há poucos estudos na espécie canina, embora haja interesse de criadores por uma progênie de sexo pré-determinado, que dependendo da demanda do mercado por fêmeas ou machos, favoreça a venda e resulte em maior ganho econômico.

Em outras espécies, especialmente em bovinos, várias técnicas já foram testadas para promover a sexagem, baseadas em diferenças entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. Entretanto, a separação espermática baseada nessa diferença do conteúdo de DNA é a única validada (1) e as duas técnicas que se fundamentam nisto são a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (2,3).

O sêmen sexado contempla células separadas para conter uma amostra que produzirá uma prole masculina ou feminina para atender às exigências dos criadores de acordo com a necessidade de produção ou do mercado (4). Uma vez que seleciona animais com aptidões específicas, que pode ser favorecida por uma progênie de sexo pré-determinado, a sexagem espermática beneficia o manejo e a eficiência reprodutiva (5) e maximiza o progresso genético entre gerações (6).

Além do ponto de vista zootécnico, a sexagem espermática também tem importância na reprodução humana assistida e em animais ameaçados de extinção (6,7), utilizando animais domésticos como modelo experimental (8). Recentemente, o sêmen sexado foi empregado em golfinhos para aumentar o número de fêmeas em cativeiro e permitir a reprodução dessa espécie (9).

O esperado é que a proporção natural de machos e fêmeas em uma progênie ou rebanho seja de, aproximadamente, 1:1 (10). O emprego do sêmen sexado permite produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas, obter descendentes de animais superiores, elevando em 15% o ganho genético comparado ao sêmen convencional (2,11).

A utilização de citometria de fluxo para sexagem espermática tem sido amplamente

difundida, devido a sua alta repetibilidade e acuidade, acima de 90% (11,12). No entanto, sua execução demanda equipamentos sofisticados, é muito dispendiosa e tem demonstrado diminuir a fertilidade dos espermatozoides, em vista dos danos causados pela técnica (3,7).

Apesar de ainda não possuir repetibilidade e reprodutibilidade que a torne uma técnica confiável e segura, uma alternativa é a centrifugação em gradiente de densidade devido à simplicidade de execução e por não exigir grandes investimentos em equipamentos (6,13).

Todavia, mais estudos são necessários, especialmente em cães, que são multíparos e o maior número de descendentes de determinado sexo pode facilitar o mercado, independentemente se os resultados sejam inferiores aos da citometria de fluxo.

Portanto, esta revisão tem como objetivo abordar a centrifugação em gradiente de densidade como uma opção às diferentes técnicas de sexagem espermática em diferentes espécies, mas que ainda não têm sido empregadas com sucesso na espécie canina.

### **Diferenças entre os espermatozoides com o cromossomo X e Y**

A separação dos espermatozoides visando a sexagem deve ser baseada em pelo menos uma diferença entre as células, como a sensibilidade ao pH, a carga elétrica da superfície da membrana, a velocidade de migração e antígenos de superfície. Porém, apesar das várias técnicas descritas para a separação espermática, somente aquelas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y são comprovadas cientificamente *in vitro* e *in vivo* (2,3).

Os espermatozoides são células haploides e contêm cromossomos autossômicos e cromossomos sexuais X ou Y que determinam o sexo. Em bovinos a sexagem espermática é baseada na maior quantidade (em média 3,80%, com variação racial entre 4,24% a 3,73%) de DNA do cromossomo X. Esta diferença varia entre as espécies, sendo que nos cães está em torno de 3,90% (3). Entretanto, diferenças raciais nos cães ainda não foram estudadas. Apesar de ser considerada uma diferença pequena, é possível mensurar o conteúdo de DNA de cada um dos espermatozoides e diferenciá-los em X e Y (7). Para tal, duas técnicas podem ser usadas, a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (6,7).

### **Centrifugação em gradiente de densidade**

O gradiente de densidade envolve um processo de centrifugação baseada na diferença de conteúdo de DNA entre os dois cromossomos (14).

Em bovinos, acredita-se que essa diferença seja de  $7 \times 10^{-4} \text{g/cm}^3$  ou 0,06% (15,16) e por ser mínima, a sexagem só é possível com a utilização de gradientes com alta resolução de densidade (15).

Os gradientes de densidade podem ser de dois tipos, contínuos ou descontínuos. Nos contínuos, a densidade do gradiente aumenta da parte superior até a parte inferior, não sendo observadas diferenças entre as camadas; e nos descontínuos, as camadas são observadas e a mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo gradativamente até a parte superior (17).

A centrifugação em gradiente pode ser realizada com diferentes concentrações de 2 a 12 camadas (18,19,20), utilizando-se vários tipos de meios, como albumina sérica, Ficoll, Ficoll-metrizoato de sódio, Percoll<sup>®</sup> isoladamente ou associado a outros gradientes, como OptiPrep, IxaPrep e Nycoprep<sup>®</sup> (21-25).

O Ficoll é uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade associado ao metrizoato de sódio (21). O OptiPrep é um componente iodinado não iônico, estéril e não tóxico, desenvolvido para estudos radiográficos (26). Em vista da sua maior densidade, o OptiPrep é mais vantajoso na separação de organelas subcelulares quando comparado ao Percoll<sup>®</sup> (26).

O gradiente de albumina sérica bovina já foi utilizado em humanos para obter amostra enriquecida com espermatozoides portadores do cromossomo Y, resultando em um aumento de 63% (27).

Contrariamente, gradientes descontínuos de albumina sérica humana (ASH), contendo 2 (10,0 e 20,0% de ASH) ou 3 camadas (7,5%, 12,5% e 20,0% de ASH) já foram utilizados para separação de espermatozoides em homens e resultaram em mais células portadoras do cromossomo X (aproximadamente 52%) (13).

O Percoll<sup>®</sup> é o mais estudado em animais por separar maior quantidade de espermatozoides com cromossomo X. É composto por sílica coloidal recoberta por polivinilpirrolidona (PVP) e é amplamente utilizado para formação de gradiente, para separação de células, vírus e outras partículas (28). Apesar disso, o Percoll<sup>®</sup> pode contaminar e afetar a qualidade da coloração com quinacrina, a qual é utilizada para determinar a quantidade de espermatozoides contendo os cromossomos X e Y. Uma alternativa é a utilização de Ficoll como meio de lavagem para retirada dos resíduos do Percoll<sup>®</sup> (22).

Em 1987, Lizuka et al. (29) descreveram a acuidade de 94%, na separação de espermatozoides humanos, utilizando a centrifugação em um gradiente de 12 camadas de Percoll<sup>®</sup> e o método de confirmação do enriquecimento foi a quinacrina. Posteriormente, voluntárias inseminadas engravidaram de bebês do sexo feminino, sem anormalidades. Em 1994, Wang et al. (13) reavaliaram o método descrito por Lizuka et al. (29), utilizando o método de confirmação da separação por hibridização *in situ* (FISH). Estes autores verificaram que a porcentagem de células espermáticas contendo cromossomos X, não ultrapassou os 57,2%, demonstrando que a quinacrina não é um método confiável para avaliar o processo de sexagem.

Blottner et al. (30) testaram a sexagem espermática de bovinos pela centrifugação em gradiente contendo 10 camadas de Percoll<sup>®</sup>, com concentrações variando entre 22% a 48%. Estes autores demonstraram enriquecimento de 75% de espermatozoides contendo cromossomos X na última fração do gradiente, confirmado por FISH e nenhuma alteração na morfologia dessas células, mantendo a sua viabilidade.

A centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi comparada ao método *Swin-up* (migração espermática) modificado e demonstrou que o primeiro deve ser o de escolha para enriquecimento de X e o segundo para o enriquecimento de Y (31). Além disso, as células colhidas no fundo do tubo (Percoll<sup>®</sup> 85%) também contém mais X do que aquelas colhidas na superfície que contém mais Y. Quando foi utilizado um gradiente de Percoll<sup>®</sup> em oito camadas, a motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X foi aumentada em três vezes (32), o que também pode contribuir para o maior número de fêmeas nascidas.

Samura et al. (33) também compararam o Percoll<sup>®</sup> e *Swin-up*, além do *Glass wool* (que é a separação em lã de vidro), e não observaram diferença significativa em relação a motilidade dos espermatozoides X e Y nos 3 métodos, apenas um aumento sutil da motilidade de X e diminuição de Y quando utilizado o gradiente de Percoll<sup>®</sup>. No entanto, nenhum desses métodos foi eficaz para a sexagem espermática.

Apesar dos resultados contraditórios a respeito do gradiente de densidade de Percoll<sup>®</sup>, a capacidade de rolamento dos espermatozoides contendo o cromossomo Y é reduzida, com redução da fertilidade, resultando em aumento do número de fêmeas geradas pela amostra (34).

A associação do gradiente de Percoll<sup>®</sup> contendo 7 densidades e NycoPrep<sup>®</sup> com diferentes concentrações foi capaz de separar amostras contendo 94% de espermatozoides humanos com cromossomos X, confirmadas por FISH. Os autores concluíram que os resultados poderiam ser comparados à separação por citometria de fluxo (23).

Em humanos, apesar dos resultados satisfatórios, tanto na sexagem, quanto na separação de espermatozoides viáveis para procedimentos como a IA e a PIV, o uso de Percoll<sup>®</sup> foi

proibido devido aos relatos de endometrite em mulheres que foram inseminadas com sêmen previamente tratado em gradientes compostos por meios coloidais, contendo sílica (35), mas em animais não há relatos semelhantes.

A associação de Percoll® e OptiPrep® mostrou resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual e repetibilidade da técnica, além de não comprometer a fertilidade dos espermatozoides, mantendo-os viáveis à inseminação artificial (36). Além disso, o IxaPrep (polissacarose e iodixanol) é outra alternativa e surgiu em 1996 para substituir o Percoll® e evitar seus efeitos tóxicos sobre os espermatozoides (24), mas ainda hoje também não é utilizado comercialmente.

Em bovinos, o gradiente de Percoll® em 12 camadas, apresentou acuidade média de 70% e pureza de 81%, aliada a manutenção da capacidade fertilizante das células sexadas, isto é, sem alterações significativas em relação ao sêmen não-sexado. A IA com o sêmen sexado por este método resultou em uma taxa de gestação de 75%, acuidade de 65 a 70%, e taxa de nascimento de fêmeas de 70,7%, utilizando sêmen fresco. Mas o enriquecimento dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y foi confirmado pela coloração com quinacrina mostarda (19), o que conforme Check et al. (18) não é um método seguro de validação da sexagem.

Houve taxa de 80% de espermatozoides bovinos contendo o cromossomo X no sedimento utilizando gradiente de Percoll® com 8 camadas, os resultados foram relacionados a maior motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X antes da centrifugação, o que favoreceu a sua sedimentação (37). Fato este que não foi confirmado por Lima (36), uma vez que as amostras que apresentaram maior motilidade antes da centrifugação não foram as mesmas que tiveram maior concentração de espermatozoides contendo o cromossomo X.

Resultados positivos também foram observados na utilização de gradientes de densidade com OptiPrep, que pode ser uma alternativa ao Percoll®, uma vez que as amostras de sêmen centrifugadas neste gradiente e utilizadas na inseminação artificial de vacas não demonstraram alterações na fertilidade, resultando em taxa de prenhez de 80% (36). No entanto, estudos posteriores afirmaram que o Percoll® como substância formadora de gradiente de densidade tem vantagens quando comparado ao OptiPrep em relação a repetibilidade da técnica, sendo considerado mais confiável (25,38).

Acredita-se que a criopreservação possa alterar a separação das células utilizando este método, já que amostras de sêmen não-sexado descongelados, quando submetidas à centrifugação em gradiente de densidade de Percoll®, apresentaram menor acuidade de separação dos espermatozoides X (em torno de 60 a 65%), quando comparadas as amostras de sêmen fresco (25,38).

Até o momento, os gradientes contendo entre 8 e 12 camadas de Percoll separaram mais espermatozoides com cromossomos X, com acuidade de 75%, provavelmente devido a maior densidade e número de camadas, respectivamente. A coloração com quinacrina foi o método utilizado para confirmar a taxa de enriquecimento de X e há uma patente depositada no Brasil descrevendo a metodologia (6,19).

Em cães, o método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll®, na maioria dos estudos, foi descrito para separação de contaminantes celulares do ejaculado, como hemácias e células inflamatórias. Amostras preparadas sobre gradiente de Percoll®, nas concentrações de 45 e 90%, e centrifugadas a 400xg por 20 minutos, mantiveram a motilidade espermática e apresentaram considerável taxa de recuperação dos espermatozoides, mas não foi eficaz em separar as células dos contaminantes (39).

Silva (40), utilizando a centrifugação em gradiente de Percoll® nas concentrações 90, 85 e 80%, a 560xg, por 30 minutos, reportou diminuição na qualidade espermática, especialmente a motilidade ( $85,3\% \pm 8,3$  versus  $40,6\% \pm 22,6$ ,  $p < 0,001$ ), vigor ( $4,5 \pm 0,6$  versus  $2,2 \pm 1,1$ ,  $p < 0,001$ ) e concentração espermática ( $133,3 \pm 62,6 \times 10^6$  versus  $15,3 \pm 10,1 \times 10^6$

espermatozoides,  $p < 0,001$ ), mas sem alterar a integridade da membrana ( $80,8 \pm 8,9$  versus  $80,9 \pm 9,5\%$ ,  $p = 0,95$ ) e a porcentagem de células morfológicamente normais ( $66,2 \pm 12,9$  versus  $69,5 \pm 14,5\%$ ,  $p = 0,19$ ). No entanto, a taxa de enriquecimento dos espermatozoides contendo o cromossomo X não foi suficientemente alta para sua aplicação comercial, identificando média de 41,2% de X e 58,8% de Y pré-centrifugação e um aumento ( $p = 0,019$ ) na proporção de X/Y após a centrifugação (49,3% de X e 50,7% de Y) (40).

Apesar da centrifugação em gradiente de densidade apresentar resultados divergentes e diferentes protocolos, sua utilização é segura, simples e de baixo custo, e para que seja aplicada comercialmente necessita de adaptações e repetibilidade que confirme a sua eficácia. Ademais, embora haja descrições de aproximadamente 70% de nascimentos de fêmeas bovinas após o emprego da técnica, essa taxa ainda é considerada baixa, visto que há a possibilidade de 30% de nascimento de machos, em uma espécie unípara. No entanto, cães são multíparos, e mesmo com o nascimento desta porcentagem de machos, a maioria da ninhada será de fêmeas, favorecendo o mercado, resultando em ganho econômico, já que na maioria das raças caninas, as fêmeas são mais valorizadas.

### **Métodos de confirmação da sexagem espermática**

Para a avaliação da porcentagem de espermatozoides X e Y em uma amostra e confirmação do enriquecimento de uma dessas células por uma determinada técnica de sexagem espermática, alguns métodos são utilizados como a própria citometria de fluxo, dessa vez para avaliar a ocorrência da separação, além da FISH, da coloração com quinacrina mostarda e da PCR.

#### *Citometria de fluxo*

A validação por citometria de fluxo da separação espermática segue o mesmo princípio utilizado para a sexagem. Os cromossomos sexuais têm diferentes conteúdos de DNA e a fluorescência emitida por eles é proporcional a essa diferença. Os espermatozoides passam pelo citômetro de fluxo por uma fila única, em alta velocidade e pressão e recebem a incidência do feixe de laser. Aqueles que contem o cromossomo X emitem um sinal de fluorescência maior do que os que possuem o cromossomo Y, devido ao seu maior conteúdo de DNA (41), e desta maneira é possível determinar a pureza da amostra em relação ao enriquecimento.

#### *FISH – Hibridização in situ por fluorescência*

A FISH é um método que identifica os cromossomos em qualquer tipo celular, de acordo com a sonda utilizada (37). Este método também utiliza um corante fluorescente, que é capaz de separar os espermatozoides contendo os cromossomos X e Y de acordo com a intensidade de fluorescência que emitem (2) ou a cor quando uma sonda dupla é usada. Este método identifica sequências gênicas pelo princípio da complementaridade de nucleotídeos do DNA e RNA a partir de sondas de DNA (37). A marcação específica no cromossomo é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes e para a análise são utilizados sistemas computadorizados (42).

Essa técnica requer sondas moleculares de sequências completas de genes conhecidos ou fragmentos de DNA, que se ligam ao gene específico na amostra que está sendo analisada (42).

A FISH, por meio de suas diferentes sondas e princípio da complementariedade de nucleotídeos do DNA, tem sido utilizada principalmente em humanos e ruminantes. A

exemplo disso, já foi utilizada para reavaliar o método de coloração com quinacrina na confirmação da sexagem espermática de humanos por centrifugação em gradiente de densidade, e demonstrou que essa coloração, descrita por Lizuka et al. (29), cuja acuidade havia sido reportada como 94%, não é confiável, uma vez que as células espermáticas contendo cromossomos X ao serem reavaliadas pelo método FISH tiveram porcentagem inferior a 57,2% (13).

Andersen e Byscov (23) e Blottner et al. (30) também utilizaram a FISH para confirmar o enriquecimento de espermatozoides contendo cromossomos X após sexagem pelo método de centrifugação em gradiente de densidade, e pelo método de gradientes de albumina, demonstrando que a técnica FISH é interessante como método de validação da sexagem espermática e pode ser considerada confiável (43).

A FISH pode apresentar vantagens em relação à reação em cadeia da polimerase (PCR) e a coloração com quinacrina, pois como utiliza sondas específicas de DNA dos cromossomos, os resultados são mais confiáveis; os espermatozoides são analisados individualmente e não em grupos; e vários espermatozoides podem ser marcados de forma rápida e precisa (42).

Porém, essa técnica ainda é muito trabalhosa e dispendiosa (43). Quando apenas uma sonda é utilizada, alguns espermatozoides exibem sinal de hibridização, mas há aqueles que não apresentam sinal algum, e então se pressupõe que estes são portadores do outro cromossomo. No entanto, essa suposição é inaceitável, uma vez que os espermatozoides podem não ser corados por várias razões, como a falha na hibridização ou presença de cromossomos aneuploides. Para resultados mais confiáveis, devem ser usadas colorações duplas, ou até triplas, encarecendo e aumentando o grau de dificuldade do procedimento (42).

### *Quinacrina mostarda*

A quinacrina é um método que cora o corpúsculo F do cromossomo Y, o qual se encontra na região distal do seu braço curto. Em 1988, a partir dessa coloração, foi demonstrada a presença do corpúsculo F (identificado como corpúsculo fluorescente) em diversas espécies, como bovinos, suínos, leporinos, murinos, cães, ratos e também no homem (44).

No entanto, a quinacrina pode produzir resultados falsos positivos e falsos negativos em células em interfase, como já demonstrado em humanos (18).

Vale ressaltar então que os resultados de trabalhos que utilizaram a coloração com quinacrina para confirmar a sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> devem ser interpretados com cautela, uma vez que a quinacrina pode falsamente aumentar o enriquecimento de X, e diminuir o de Y, apresentando resultados incorretos, já que não foi confirmado pela PCR, FISH (18) ou citometria de fluxo. O Percoll<sup>®</sup> é considerado um contaminante, interferindo no processo de coloração com a quinacrina. Nestes casos, o Ficoll pode ser utilizado como um meio para lavagem e retirada dos resíduos de Percoll<sup>®</sup>, mas estes achados não foram confirmados (22). Meios contendo albumina também resultam em coloração inespecífica dos cromossomos autossômicos, não corando apenas o cromossomo Y, conforme desejado (45).

Diante disso, os resultados da separação espermática por gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup> e outros que utilizaram a coloração com quinacrina como indicador da separação devem ser reavaliados (18).

### *Reação em cadeia de polimerase (PCR)*

A validação da sexagem espermática requer procedimentos seguros e confiáveis. A

PCR permite a replicação do DNA *in vitro* e a amplificação de sequências específicas com alta sensibilidade e especificidade (46). A PCR convencional pode quantificar a relação de cromossomo X e Y em uma amostra de sêmen. No entanto, em diferentes lotes de sêmen não-sexado de um mesmo reprodutor foi reportada grande variação, o que a caracterizou como uma técnica instável e insegura (16). Mas, o desenvolvimento de nova modalidade, a PCR em tempo real ou quantitativa, restaurou sua confiabilidade, uma vez que, a utilização de sondas fluorescentes, possibilita estudos qualitativos e quantitativos, reportados com alto grau de acurácia, repetibilidade e reprodutibilidade. Em estudo realizado em bovinos não houve diferença significativa quando comparada a citometria de fluxo (47).

Além disso, têm as vantagens de permitir a utilização de uma pequena alíquota, o que no caso do sêmen, especialmente de cão, que conta com pequeno volume, é de interesse; além de poder ser realizada em grande escala (46).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sexagem espermática por centrifugação em gradiente de densidade, se empregada com sucesso, produz descendentes de sexo pré-determinado a baixo custo e é comercialmente mais acessível do que as demais devido a facilidade de execução.

A citometria de fluxo, apesar de ser a técnica de separação espermática que apresenta resultados mais confiáveis e precisos, é muito dispendiosa, exige equipamentos sofisticados e é de difícil execução.

Apesar de ainda não possuir repetibilidade e reprodutibilidade para ser aplicada comercialmente, as vantagens da centrifugação em gradiente de densidade são a simplicidade e a economia da técnica, incentivando mais estudos nessa área, por ser uma alternativa viável, especialmente na espécie canina.

## REFERÊNCIAS

1. Palma GA. Biotecnologia de la reproduccion. 1a ed. Buenos Aires: El Paraíso; 2001. p.318-85.
2. Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:93-107.
3. Garner DL. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and Y chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology.* 2009;71:11-21.
4. Fernandes JRC, Rodrigues P. Sexagem de sêmen. *Agrotec Rev Tec Cient Agric.* 2012;4:28-30.
5. Parrilla I, Vasquez J, Gil MA, Caballero I, Alminana C, Roca J, et al. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;64:86-98.
6. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Lucio AC, Resende MV. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™. *Rev Bras Zootec.* 2011;40:1680-5.
7. Seidel Jr GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 2007;68:443-6.



8. Pukazhenthil B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18:77-90.
9. Robeck TR, Montano GA, Steiman KJ, Smolensky P, Sweeney J, Osborn S, et al. Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim Reprod Sci.* 2013;139:168-81.
10. Clutton-Brock TH, Iason GR. Sex ratio variation in mammals. *Q Rev Biol.* 1986;61:339-74.
11. 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;66:929-36.
12. Welch GR, Johnson LA. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X and Y sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology.* 1999;52:1343-52.
13. Wang HX, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. Continuous Percoll™ gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1994;9:1265-70.
14. Sumner AT, Robinson JA. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1976;48:9-15.
15. Windsor DP, Evans G, White IG. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. *Mol Reprod Dev.* 1993;5:155-71.
16. Chandler JE, Canal AM, Paul JB, Moser EB. Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates. *Theriogenology.* 2002;57:1327-46.
17. Density Gradient Media. Applications and products Axis-Shield. 4a ed. Norway: Axis-Shield; 2003.
18. Check ML, Bollendorf A, Check JH, Hourani IW, Long R, Mc Monagle K. Separation of sperm through a 12-layer Percoll™ column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. *Arch Androl.* 2000;44:47-50.
19. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Ramalho MFPDT. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado. Brasil Fapesp/Unesp/Uspsbr PI 0300604-2. 17 Jun 2003.
20. Matás C, Vieira L, Vasquez GFA, López AK, Úbeda ALR, Gadea J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll™ gradients on boar sperm function. *Anim Reprod Sci.* 2011;127:62-72.

21. Shastry PR, Hegde UC, Rao SS. Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature*. 1977;269:58-60.
22. Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Lizuka R. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll™ density gradient centrifugation. *Fertil Steril*. 1983;40:661-5.
23. Andersen CY, Byskov AG. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997;76:131-4.
24. Mc Cann CT, Chantler E. Properties of sperm separated using Percoll™ and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. *Int J Androl*. 2000;23:205-9.
25. Resende MV, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lucio AC, Lima VFMH. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll™ and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Cienc Anim Bras*. 2009;10:581-7.
26. Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic isoosmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem*. 1994;220:360-6.
27. Ericsson JR, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*. 1973;246:421-4.
28. Vicente R, Nadeau D. Adjustment of the osmolality of Percoll™ for the isopycnic separation of cells and cell organelles. *Anal Biochem*. 1984;141:322-8.
29. Lizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T. Sexing of human sperm by discontinuous Percoll™ density gradient and its clinical application. *Hum Reprod*. 1987;7:573-5.
30. Blottner S, Schwerin M, Bottcher M, Pitra C. Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll™ density gradient. *Arch Tierz*. 1993;36:153-62.
31. Check H, Kwirenk D, Katsoff D, Press M, Breen E, Baker A. Male: female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus Percoll™ preparation of inseminated sperm. *Arch Androl*. 1994;33:63-5.
32. Watkins AM, Chan PJ, Patton WC, Jacobson JD, King A. Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous: computerized analyses. *Arch Androl*. 1996;37:1-5.
33. Samura O, Maharu N, He H, Okamoto E, Ohama K. Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum Reprod*. 1997;12:2437-42.
34. Lin SP, Lee RKK, Tsai YJ, Hwu YM, Lin MH. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll™ density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet*. 1998;15:565-9.

35. Makkar G, Ng HY, Yeung SB, Ho PC. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. *Fertil Steril*. 1999;72:796-802.
36. Lima VFMH. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade [livre docência]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2005.
37. Kobayashi J, Oguro H, Uchida H, Kohsaka T, Sasada H, Sata E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll® gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. *J Reprod Dev*. 2004;50:463-9.
38. Lucio AC. Influência do método de separação dos espermatozóides viáveis (“swim up”) na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.
39. Phillips TC, Dhaliwal GK, Verstegen-Onclin KM, Vertegen JP. Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. *Theriogenology*. 2012;77:39-45.
40. Silva CBAR. Sexagem espermática por gradiente de densidade de Percoll® em cães [dissertação]. Franca: Universidade de Franca; 2013.
41. Pergorato LMC, Hossepian de Lima VL. Selección del sexo em mamíferos. In: Palma GA. *Biocnologia de la reproduction*. 1a ed. Balcarce: Inta; 2001. p.317-51.
42. Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 2006;65:958-78.
43. Rens W, Yang F, Welch G, Revell S, O’Brien PC, Solanky YN, et al. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction*. 2001;121:541-6.
44. Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kano Y, Takeshima T, et al. Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species? *Theriogenology*. 1988;239:1083-9.
45. Van Kooji RJ, Van Oost BA. Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. *Fertil Steril*. 1992;58:384-6.
46. Sverzut VG. Determinação da porcentagem de espermatozoides portadores de cromossomo X e Y no sêmen sexado mediante PCR em tempo real [dissertação]. Pirassununga: Universidade de São Paulo; 2011.
47. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*. 2006;66:2202-9.

**Recebido em:**

**Aceito em:**