

**PROPORÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PORTADORES DE CROMOSSOMOS X
OU Y E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TESTOSTERONA EM CAPRINOS
SEGUNDO A CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

JOYCE MAGALHÃES SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina
Estado do Piauí – Brasil
Março - 2006

**PROPORÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PORTADORES DE CROMOSSOMOS X
OU Y E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TESTOSTERONA EM CAPRINOS
SEGUNDO A CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

JOYCE MAGALHÃES SILVA

Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Dissertação apresentada ao Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina

Estado do Piauí – Brasil

Março - 2006

**PROPORÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PORTADORES DE CROMOSSOMOS X
OU Y E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TESTOSTERONA EM CAPRINOS
SEGUNDO A CONFORMAÇÃO ESCROTAL**

Joyce Magalhães Silva.

Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

José Adalmir Torres de Sousa
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Rômulo José Vieira
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Piauí
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Marta e Agmar, que sempre foram meu exemplo de vida, pelo apoio que me deram mesmo estando longe.

- Ao Prof. Rômulo por ter me aceito como orientada e confiar na minha capacidade profissional.

- Ao Prof. Adalmir, meu amado Chefinho, por sua amizade e fundamental apoio na realização deste trabalho.

- A Profa. Vera, co-orientadora e amiga, pela amizade e por seu constante incentivo e empenho para que esse trabalho fosse realizado.

- A Tia Verônica que sempre me fez sentir como uma filha me dando suporte nos momentos difíceis, quando eu quase desisti.

- A família Veloso, em especial, Tia Emília, Tio Jurandir, Maria de Jesus, que muitas vezes longe estiveram tão presentes conseguindo encher meu coração de alegria e amor, quando tudo parecia estranho e eu me sentia perdida, fazendo uma grande diferença em minha vida.

- Ao meu namorado, Marlon, que tornou minha vida mais leve e cheia de amor, por ser um grande amigo nos momentos difíceis e, principalmente uma pessoa tão carinhosa e amorosa em todos os momentos.

- Aos meus eternos mestres e amigos, Profa. Valéria, Prof. Jael, Prof. Iberê, Prof. Adalmir, Prof. Rômulo, Profa. Acelina, Prof. Nicodemos, que para sempre serão amados e admirados, pois não só acreditaram na minha persistência e dignidade mesmo quando todos me julgavam, mas também sofreram e vibraram comigo, me acalmando ou me trazendo a realidade quando necessário. Gostaria de dizer o quanto é bom contar com vocês, mesmo que tais palavras não bastem para expressar meu amor e minha gratidão.

- Ao aluno de graduação, Maurício Salviano, pela colaboração nas coletas e congelamento de sêmen.
- Aos amigos Luís Lugosa, Justino, D.Fátima, Sr. Fernando, Sr. Francisco, pela agradável convivência e colaboração sempre que necessário.
- Ao Prof. Francisco Assis pela compreensão e valiosa ajuda para que os treinamentos necessários fossem realizados.
- Ao Prof. João Batista e Prof. Nicodemos por me socorrer na estatística deste trabalho.
- Ao Sr. “Zé da Burra”, Dirceu e Antônio Francisco pela compreensão, amizade e auxílio na manipulação dos animais.
- Ao colega Antônio de Sousa Júnior por me ensinar que nem sempre uma amizade resiste a verdade, pois às vezes as pessoas precisam escutar o que querem escutar.
- À Universidade Federal do Piauí pela acolhida, particularmente à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação e funcionários pelos ensinamentos, convivência e colaboração.
- Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para realização dos treinamentos necessários e aquisição dos materiais necessários para realização deste trabalho.
- A CAPES pela concessão da bolsa.

A vida é uma sobreposição de idéias, um conjunto de forças, onde o que conta é o ser fiel, a nós, ao que construímos e ao que acreditamos. É na caminhada da vida que passamos a achar o sentido dela. A melhor maneira de compreender é fazer.

Kant

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Características Reprodutivas da Espécie Caprina	15
2.2 Avaliação da Qualidade do Sêmen	16
2.3 Concentrações Plasmáticas de Testosterona	17
2.4 Determinação do sexo	19
2.5 Métodos de Sexagem Espermática	23
2.5.1 Diferenças Químicas	24
2.5.2 Diferenças Físicas	24
2.5.2.1 Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência – FISH	27
3. CAPÍTULO ÚNICO	
3.1 Resumo	31
3.2 Introdução.....	32
3.3 Material e Métodos	34
3.4 Resultado e Discussão.....	36
3.5 Referências Bibliográficas	36
3.6 Conclusão	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SRD = Sem Raça Definida

GI = Grupo um

GII = Grupo dois

GIII = Grupo três

ng = Nanograma

% = Porcentagem

FISH = Hibridização *in situ* por fluorescência

Sptz = Espermatozóide

mL = mililitros

M = molar

Tab = Tabela

Fig = Figura

IA = Inseminação Artificial

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01. Diferenças propostas para a separação de espermatozóides X e Y 23

Quadro 02. Técnicas usadas para identificação ou separar espermatozóides portadores dos cromossomos X ou Y, baseadas nas suas diferenças físicas 25

CAPÍTULO ÚNICO

Tabela 01. Porcentagem de espermatozóides Y, em caprinos SRD, segundo conformação escrotal40

Tabela 02. Concentração sérica de testosterona, em caprinos SRD, segundo conformação escrotal 40

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO ÚNICO

Figura 01. Fotografia da região escrotal de caprinos dos diferentes grupos, sendo GI, animais sem bipartição; GII, animais com bipartição de até 50% do comprimento testicular, e GIII, animais com bipartição superior a 50% 39

ANEXOS

Figura 01. Fotografias representativas das colheitas de sangue, sêmen e congelação do sêmen com aparelho programável automatizado para criopreservação de sêmen (Tetakon – TK 3000) 59

RESUMO

PROPORÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PORTADORES DE CROMOSSOMOS X OU Y E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TESTOSTERONA EM CAPRINOS SEGUNDO A CONFORMAÇÃO ESCROTAL

A separação dos espermatozóides portadores do complemento cromossômico sexual masculino (Y) e do feminino (X) constitui uma alternativa extremamente interessante para a indústria de produção animal devido à possibilidade de ganho econômico e gerencial, decorrente da escolha programada do sexo dos descendentes. Fatores como, bipartição do escroto, que estão envolvidos com o desempenho reprodutivo de machos caprinos, parecem ter influência no desvio da proporção sexual. O presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do grau de bipartição escrotal sobre a proporção de espermatozóides com cromossomos X ou Y e concentração sérica de testosterona. Para tanto, foram utilizados 12 reprodutores caprinos divididos em grupos de três animais, sendo o grupo GI de caprinos sem partição escrotal, o GII de caprinos com partição escrotal de até 50% do comprimento testicular e GIII de caprinos com partição escrotal superior a 50% do comprimento testicular. Amostras sanguíneas foram colhidas por punção jugular e centrifugados para obtenção de soro. Dosagens de testosterona foram realizadas pelo método de radioimunoensaio (RIA). Para identificação o cromossomo Y, foi utilizada a Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH). Os dados apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$), porém correlações entre níveis séricos de testosterona e presença do cromossomo Y não foi observada.

Palavras – chave: proporção sexual, espermatozóides, FISH, testosterona, caprinos.

**PROPORTION OF SPERM THAT BEAR X OR Y CHROMOSOME AND SERIC
TESTOSTERONE COCENTRATIONS OF GOATS AGREEMENT SCROTAL
CONFORMATION**

ABSTRACT

The separation of X or Y – bearing spermatozoa represents an extremely interesting alternative in animal production industry, due to the possibility of economic gains and management enhancement by choosing the sex of the offspring.

Scrotal bipartition has been envolved with reproductive performance of male goats. The objective of present study was to show the influence of this bipartition in seric testosterone concentration and frequence of Y chromossome in male goats.

It was obtained samples of 12 males goats, three groups, GI (no partition), GII (partition until 50% of scrotal length) e GIII (partition 50% larger). The seric testosterone was determined by radioimmunoessay (RIA) and the Y cromossome detection was stabelished by Fluorescence *In Situ* Hybridization.

The result data shows significant difference ($\alpha = 0,05$) but no correlation, on the groups for seric testosterone concentration and Y cromossome occurrence (Student “t” test).

Key words:sex , spermatozoa, FISH, testosterone, caprine.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o rebanho caprino mundial contém em torno de 746 milhões de animais, sendo que cerca de 94,2% desse total encontram-se em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (FAO, 2003). O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 9.582.000 (nove milhões e quinhentos e oitenta e dois mil), sendo que 93% destes animais estão distribuídos pela região nordeste do país, onde se localiza o Estado do Piauí com um rebanho de 1.427.556 (um milhão quatrocentos e vinte sete mil e quinhentos e cinquenta e seis) animais, sendo o terceiro maior produtor de caprinos, ficando atrás apenas da Bahia e de Pernambuco (IBGE, 2003), onde a caprinocultura é desenvolvida, basicamente, em sistema de criação extensiva, no qual os animais permanecem soltos em pastagem nativa.

A produção média atual de carne caprina no semi-árido Nordeste é de 2,8 kg/ha na caatinga nativa, índice considerado ainda baixo, o que ocasiona a necessidade de intensificação dos sistemas de produção, associando-se a melhoria nas condições de manejo ao uso de animais geneticamente superiores. Diante disso, tem havido uma crescente demanda por manejos reprodutivos e biotécnicas da reprodução que visem o incremento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas.

Escolher o sexo da descendência dos reprodutores tem sido um constante desejo dos criadores, já que tal possibilidade permitiria obter maiores ganhos em produtividade (carne, leite, reprodutores geneticamente valiosos), além de melhor gerenciamento do sistema de produção.

Em rebanhos caprinos destinados à produção de leite, a seleção de sexo estará, preferencialmente, dirigida à obtenção de fêmeas. Assim, as perdas oriundas do nascimento

de machos (50%) serão reduzidas ao mínimo e a produção de leite poderá ser aumentada por meio da seleção genética exercida sobre as fêmeas.

Entre caprinos machos nascidos em clima tropical, existem animais cuja morfologia escrotal difere daqueles oriundos de clima temperado. Em alguns animais, o escroto se divide ao ponto de individualizar cada testículo em um “escroto próprio”, os testículos com escrotos individuais proporcionariam maior aeração e melhor termorregulação e, em consequência, melhor libido e qualidade de sêmen, permitindo suportar maior taxa de fertilidade, o que poderia influenciar na proporção sexual das crias e nos níveis séricos de testosterona.

Apesar da proporção esperada em uma população para machos e fêmeas ser de 1: 1, a bipartição do escroto, parece estar envolvida no desvio da proporção sexual; sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo, verificar a influência da conformação escrotal sobre a proporção de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y e concentrações séricas de testosterona segundo a conformação escrotal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DA ESPÉCIE CAPRINA

Ao se avaliar os atuais índices reprodutivos dos caprinos no Nordeste Brasileiro, constata-se que estes retratam limitações no que diz respeito às técnicas de manejo utilizadas, no potencial genético dos animais e na diversidade das condições ambientais predominantes (ARAUJO FILHO *et al.*, 1994).

O macho caprino apresenta certa estacionalidade produtiva e dependente de uma série de variáveis. Estas variáveis podem ser de ordem intrínseca, destacando-se a raça, o peso e a idade; e extrínsecas, como o fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação (NUNES *et al.*, 1997).

A análise do sêmen é o método mais utilizado para estimar o potencial de fertilidade de um macho (CAVALCANTE, 2003). O conhecimento do potencial de fertilidade de um macho é requisito imprescindível para sua classificação como reprodutor ou doador de sêmen (BORQUE *et al.*, 1993).

Alterações nas características do sêmen e na libido desses animais têm sido atribuídas à variações estacionais (CAVALCANTE, 2003). As causas residem, em grande parte, nos diferentes componentes do clima, como evidenciam trabalhos efetuados com respeito à luminosidade, temperatura e do regime de chuvas (NUNES, 1982). A amplitude da variação estacional muda em função do rebanho e individualidade do macho, representando a sensibilidade de cada animal aos fatores do meio (MANDIKI *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstraram haver diferenças na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano, em clima temperado (ROCA *et al.*, 1992; TULI & HOLTZ, 1995), e atribuíram tais diferenças ao fotoperíodo.

Na região semi-árida do Nordeste do Brasil, os efeitos climáticos são bem definidos, determinando duas épocas: seca e chuvosa, interferindo na disponibilidade de alimento, na temperatura e conseqüentemente na atividade sexual do macho caprino. (SILVA & NUNES, 1984).

Nas condições semi-áridas, o fator temperatura parece ser o ponto fundamental das variações quanti-qualitativas do sêmen caprino. É bem conhecido que o tamanho dos testículos, assim como a eficiência da espermatogênese de caprinos está no seu nível máximo durante a estação de acasalamento e diminui durante a estação não reprodutiva (COLAS *et al.*, 1990).

A duração da estação de acasalamento varia inversamente com a latitude, aumentando quando a latitude é menor, apresentando os rebanhos caprinos de média e alta latitude (mais alta que 35°) marcada estacionalidade (LEBOEUF *et al.*, 2000), o que não acontece na no estado do Piauí com latitude 05°05'21" sul, longitude 42°48'07" oeste, altitude 72m.

2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN

Por mais de um século, pesquisadores têm lutado para prever acuradamente a fertilidade das amostras seminais do macho, pelas características do sêmen como à qualidade da população espermática presente na dose inseminante: motilidade, integridade da membrana, concentração, volume e aspecto do sêmen, movimento em massa (turbilhonamento) e morfologia espermática (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993). Nenhum teste foi desenvolvido para prever isoladamente a fertilidade de um ejaculado, mas quando vários testes são combinados cuidadosamente, os ejaculados podem ser selecionados para utilização com potencial de apresentar a mais alta fertilidade (HAFEZ, 2003).

Macroscopicamente, o sêmen na espécie caprina, deve possuir uma aparência cremosa ou leitosa, com cor amarelada (marfim), ou esbranquiçada (CBRA, 1998), que são

indicativos de alta concentração espermática. Geralmente, animais jovens e aqueles de menor tamanho dentro de uma mesma espécie produzem menor volume de sêmen (HAFEZ, 2003). Freqüentes ejaculações, tipo de colheita, condicionamento, idade, tamanho testicular e higidez testicular alteram a concentração espermática podendo resultar em menor volume; quando dois ejaculados são obtidos consecutivamente, o segundo usualmente apresenta menor volume (KAYA *et al.*, 2002). Em caprinos o volume do ejaculado varia de 0,2 a 2,0 mL (MIES FILHO, 1987). O movimento em massa é classificado de acordo com sua intensidade com notas que variam de 0 a 5 (BARIL *et al.*, 1993).

A avaliação do estado morfológico e motilidade do espermatozóide é indicação crucial de sua capacidade fertilizante (BLOTTNER *et al.*, 2001). O índice de anormalidades máximo permitido em caprinos é de 15% (CBRA, 1998). As alterações morfológicas do espermatozóide podem ser classificadas em primárias, secundárias ou terciárias (HAFEZ, 2003) atingindo várias partes constituintes, tais como, acrossomo, núcleo, colo e peça intermediária (MIES FILHO, 1987). As anormalidades primárias são devido a falhas na espermatogênese, enquanto que as secundárias ocorrem durante a passagem pelo epidídimo, já as terciárias ocorrem durante ou após a ejaculação (HAFEZ, 2003).

Neste sentido Nunes *et al.*, (1983) avaliaram as características espermáticas de caprinos da raça Moxotó, com escroto bipartido e não bipartido, não encontrando diferenças significante entre as variáveis volume do ejaculado, motilidade massal e concentração, já no que diz respeito à porcentagem de patologias espermáticas, teste de termo-resistência e motilidade progressiva individual, os resultados mostraram diferença estatística, sugerindo que os animais de escroto bipartido, apresentam espermatozoides mais resistentes e menor número de patologias. Diante disso, concluíram que animais com escrotal bipartido apresentam vantagens na qualidade seminal e poderiam, apresentar maior eficiência reprodutiva, entretanto ressaltaram a necessidade de trabalhos “*in vivo*” para comprovação da hipótese.

Estudos procurando relacionar a conformação escrotal com outras características reprodutivas têm sido realizados em caprinos (ALMEIDA, 2003) afim de elucidar os benefícios dessa adaptação.

2.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA

A secreção de testosterona é estimulada por gonadotrofinas hipofisárias e é modulada via fator de liberação (GnRH) do hipotálamo (FUENTES *et. al.*, 1998). O hormônio folículo estimulante (FSH) desencadeia a produção de uma proteína fixadora de andrógeno denominada Androgen Binding Protein (ABP) pelas células de Sertoli. Essa proteína, secretada dentro da luz do túbulo seminífero, ajuda a manter um alto nível de andrógenos dentro do referido túbulo (HAFEZ, 2003). Testosterona e FSH agem através das células dos túbulos seminíferos para estimular a espermatogênese. Altas concentrações de testosterona em fluidos que envolvem os túbulos seminíferos (100 a 300 vezes maior do que no plasma periférico) são aparentemente essenciais para uma espermatogênese normal (BEARDEN & FUQUAY, 1992). A principal função do hormônio luteinizante (LH) na regulação da espermatogênese parece ser indiretamente estimulada pela liberação de testosterona pelas células de Leydig. No animal adulto, a liberação de LH comumente é seguida por uma elevação de testosterona sérica). Sugeriu-se que a concentração periférica abundante de testosterona regule a forma de secreção de LH (FORD & SCHANBACHER, 1977). A testosterona exerce um “feedback” negativo sobre o hipotálamo e hipófise anterior, possivelmente pela liberação de opióides endógenos. Portanto, altas concentrações de testosterona inibem sua liberação no nível de hipotálamo (GnRH) e hipófise (FSH e LH), enquanto baixas concentrações permitem sua liberação (BEARDEN & FUQUAY, 1992).

De acordo com Ahmad *et al.* (1996) a concentração média de testosterona em caprinos machos foi de 0,35 ng/mL na 12ª semana de idade e aumentou para 2,01 ng/mL na 20ª semana. Esses autores também observaram que o valor médio de LH na 12ª e 13ª semanas de idade foi de 5,21 ng/mL, havendo uma diminuição logo em seguida para então haver um novo aumento entre a 20ª e 21ª semanas de idade.

Variações nas concentrações de testosterona estão associadas a mudanças do fotoperíodo é responsável por diferenças estacionais na produção de espermatozóides e composição da secreção das glândulas acessórias, e conseqüentemente, na qualidade do sêmen (BORQUE *et al.*, 1993).

Estudos envolvendo determinação sérica ou plasmática de testosterona têm sido bem mais freqüentes em outras espécies domésticas em comparação aos caprinos, particularmente, nas condições tropicais do Brasil. Sabe-se que a testosterona é um dos fatores que interferem na libido do animal e conseqüentemente no número de serviços (HAFEZ, 2003).

Variações nas concentrações séricas de testosterona de caprinos foram observadas por Smith & Sherman (1994), em função da estação do ano, sendo consideravelmente mais elevada na estação de monta do outono.

Gomes *et al.*, (1971) ao pesquisarem os efeitos na concentração plasmática de testosterona verificaram valores de 10,6 ng/mL em animais submetidos a temperatura elevada e 82,2 ng/mL em caprinos criados sob condições ambientais. Eloy *et al.*, (1998) observaram que os níveis de testosterona estão envolvidos no desencadeamento da puberdade.

Macdonald e Pineda (1989), relataram que a concentração de esteróides e outros hormônios no sangue é altamente variável entre indivíduos, dependendo da idade do animal, estação do ano, hora do dia, freqüência e condições de ejaculação.

Em caprinos submetidos a deferectomia, de acordo com Batista *et al.*, (2002) não houve variação significativa nas concentrações de testosterona entre os animais deferectomizados e os do grupo controle.

2.4. IMPORTÂNCIA DA SELEÇÃO DO SEXO NA INDÚSTRIA ANIMAL

A determinação do sexo é definida como uma série de etapas ordenadas que se inicia com o estabelecimento do sexo genético, quando o oócito é fecundado por um espermatozóide portador do cromossomo X ou Y originando, respectivamente, um embrião geneticamente do sexo feminino (XX) ou masculino (XY). O sexo genético é a determinante para que a gônada indiferenciada organize-se como testículo ou ovário (sexo gonadal), estabelecendo-se, a partir da diferenciação gonadal e do seu funcionamento endócrino. O sexo fenotípico e o dimorfismo sexual dos mamíferos tem sua base genética na constituição do par de cromossomos sexuais XX ou XY, na qual a presença ou ausência

de seqüências do cromossomo Y induz a determinação primária do sexo (gonadogênese) e que, por sua vez induz as outras etapas da diferenciação sexual (HAFEZ, 2003).

Em espécies de interesse zootécnico, os estudos e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo em espermatozóides e em embriões pré-implantados intensificaram-se a partir da década de 80. Foi esse um processo diretamente ligado ao aprimoramento e à difusão das técnicas de inseminação artificial e de transferência de embriões, recursos utilizados por programas de melhoramento genético animal (TAYLOR *et al.*, 1985).

O principal efeito das tecnologias da reprodução seria o de aumentar a eficiência reprodutiva, o que significa que poucos progenitores e progenitoras seriam escolhidos para produzir um dado número de descendentes, quando comparado com os sistemas convencionais de reprodução. Geneticamente isto resultaria em um aumento da intensidade de seleção e, conseqüentemente, em um aumento do mérito genético médio da progênie. Demonstrou-se por modelos teóricos (simulações) que quando a tecnologia da reprodução era utilizada sobre uma base recorrente em uma população fechada, a taxa de melhoramento genético aumentava entre as gerações. Esta tem sido considerada a principal vantagem genética oferecida pelas tecnologias reprodutivas (NICHOLAS, 1996).

A possibilidade de produzir, em escala comercial, doses de sêmen enriquecidas com espermatozóides portadores dos cromossomos X ou Y, aumentará os benefícios da utilização da inseminação artificial (IA), conferindo-lhe um papel decisivo na maximização do progresso genético entre as gerações de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e da aptidão do rebanho (SILVERSIDES, 2001).

Um exemplo são as raças especializadas para produção de leite, nas quais a manutenção de gestações e o nascimento de animais do sexo masculino é um dos fatores de diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção. O progresso genético será maximizado em programas de criação para produção de leite em que a proporção sexual seja controlada por ocasião da inseminação artificial, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado (HOHENBOKEN, 1999).

Já nos programas de cruzamento industrial para corte a seleção de cromossomos nos espermatozóides, maximizará a produtividade e permitirá obter maior proporção de machos em relação as fêmeas. Entretanto, existem programas de cruzamento que são beneficiados pelo nascimento de maior proporção de fêmeas na primeira geração (F1). Essas fêmeas são

utilizadas como matrizes, ou seja, inseminadas por reprodutores com características de carcaça e conversão alimentar que possibilitem maior rendimento na produção de carne após o abate (HOHENBOKEN, 1999).

Além disso, a utilização de espermatozóides sexados na produção “*in vitro*” de embriões minimizará o custo do teste de progênie pois permitirá o nascimento apenas de animais do sexo desejado para avaliação zootécnica (NICHOLAS & SMITH, 1983).

A aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides depende do estabelecimento de uma metodologia que além de ser compatível com o processo de congelamento, minimize a perda de espermatozóides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos. Porém, é de se prever que em poucos anos o aperfeiçoamento da técnica de sexagem, aumento da velocidade da sexagem e diminuição da dose inseminante fará com que essa técnica possa ser incorporada à rotina da Inseminação Artificial, já que os espermatozóides sexados seriam viáveis, podendo ser congelados/descongelados com fertilidade aceitável (ALMEIDA & ALVAREZ, 2003).

A possibilidade de produzir doses enriquecidas com espermatozóides dos cromossomos X ou Y, aumentará os benefícios da utilização da IA, conferindo-lhe um papel decisivo na maximização do progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e aptidão do rebanho. Na tentativa de selecionar-se o sexo em mamíferos, principalmente nas espécies de interesse zootécnico, tecnologias vêm sendo desenvolvidas para seleção de cromossomos em espermatozóides (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000) e identificação do sexo em embriões (RAMALHO et al., 2000, MOREIRA-FILHO et al., 2000).

Apesar da proporção esperada em uma população para machos e fêmeas ser de 1:1, trabalhos demonstram uma diferença na velocidade de desenvolvimento entre os dois sexos. Sabe-se que os embriões do sexo masculino, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, desenvolvem-se rapidamente em diversas espécies (GUTIERREZ-ADAN, 2001), porém, a causa pela qual os embriões machos se desenvolvem mais rápido não está totalmente elucidada. Sendo assim, a utilização de espermatozóides sexados (X ou Y), não influenciaria no desenvolvimento dos embriões e traria a vantagem de obter a maioria de embriões do sexo feminino, ou pelo menos, retirar o efeito do meio de cultivo *in vitro* sobre o desvio da proporção sexual em favor dos machos.

Além dos aspectos sanitário e zootécnico, deve-se considerar a base científica dos métodos de seleção do sexo que evoluem rapidamente, originando conhecimentos que servirão ao desenvolvimento de soluções mais eficientes. O desenvolvimento e o aprimoramento desses métodos bem como a sua introdução na tecnologia de sêmen ou de embriões exige uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido é oportuno rever os fatores que desviam a proporção sexual, a importância da seleção do sexo no melhoramento genético e produção animal, bem como as rotas tecnológicas para a seleção do sexo (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 2000).

Quadro 01: Diferenças propostas para a separação de espermatozoides X e Y

Parâmetro	Diferença proposta entre o X e o Y	Situação atual	Referência (s)
Sensibilidade ao pH	Meio alcalino favorece o Y	Não confirmado	WINDSOR <i>et al.</i> (1993); HOSSEPIAN DE LIMA (1998)
Motilidade	Y nada mais rápido que o X	Não confirmado	BEAL <i>et al.</i> (1984), PENFOLD <i>et al.</i> (1998)
Carga elétrica da superfície	X migra para o cátodo (-)	Não confirmado	McEVOY (1992); WINDSOR <i>et al.</i> (1993);
Superfície do espermatozoide	Presença do Antígeno H-Y	Não confirmado	HENDRIKSEN <i>et al.</i> (1996); HOWES <i>et al.</i> (1997); HENDRIKSEN <i>et al.</i> , (1999)
Conteúdo de DNA	X possui mais DNA que o Y	Confirmado e validado	MORUZZI (1979); GARNER <i>et al.</i> (1983); JOHNSON (2000)
Superfície do espermatozoide	Presença de proteínas sexo-específicas para X ou Y	Em estudo	BLECHER <i>et al.</i> (1999)
Área e volume da cabeça do espermatozoide	X possui um maior área e volume	Em estudo	Van MUNSTER <i>et al.</i> (1999); CHANDLER <i>et al.</i> (1999)
Diferença de densidade	X é mais denso que Y	Confirmado	WINDSOR <i>et al.</i> (1993)

2.5. MÉTODOS DE SEXAGEM ESPERMÁTICA.

Os primeiros estudos realizados procurando separar as duas populações de espermatozoides remontam à década dos vinte, quando foi tentada, sem sucesso, a separação dos dois tipos celulares recorrendo à centrifugação de sêmen (JOHNSON &

WELCH 1999). Em anos recentes, devido ao acúmulo de conhecimentos sobre a estrutura dos espermatozóides X e Y, diversas técnicas de separação têm sido propostas explorando as diferenças químicas e físicas existentes entre essas duas populações celulares.

2.5.1. Diferenças Químicas

As técnicas de separação baseadas nas diferenças químicas recorrem à detecção de macromoléculas da membrana celular, denominadas antígenos da superfície espermática, que estão relacionadas com a presença do cromossomo X ou Y no núcleo. Até recentemente, a maioria dos trabalhos realizados foi direcionada à detecção do chamado antígeno HY (antígeno de histocompatibilidade menor) cuja expressão está restrita a indivíduos portadores do cromossomo Y. Para separar os espermatozóides dos diferentes sexos, recorreu-se ao emprego de diversas técnicas imunológicas, utilizando anticorpos anti-HY. Muitos estudos tentaram a separação dos espermatozóides baseando-se no antígeno HY, porém ainda não se obteve a precisão esperada (HENDRIKSEN *et al.*, 1993). Provavelmente, isto deve-se ao fato de o antígeno HY não ser totalmente específico dos espermatozóides Y; mesmo predominando nos espermatozóides Y, ele está presente em proporções variáveis nos espermatozóides X (HOPPE & KOO, 1984).

Blecher *et al.* (1999) relataram o desenvolvimento de um método de sexagem imunológica dos espermatozóides, pela identificação de substâncias antigênicas mais específicas que estivessem disponíveis na superfície espermática, obtiveram proteínas da membrana que purificaram por cromatografia de coluna, geraram anticorpos específicos, e anunciaram ter achado assim substâncias, chamadas de 'Sex Specific Proteins' (SSP), as quais seriam capazes de marcar cromossomos sexuais (X e Y).

Estudos eletroforéticos da membrana dos espermatozóides X ou Y, demonstraram que não é possível a identificação das diferenças entre proteínas de membrana dos espermatozóides X ou Y (HENDRIKSEN *et al.*, 1999).

2.5.2. Diferenças Físicas

As técnicas que utilizam diferenças celulares físicas para detectar e/ou separar os espermatozóides X e Y, foram bem descritas por Pegoraro & Hossepian de Lima (2001), e estão sintetizadas na Quadro 02.

Quadro 02. Técnicas utilizadas para identificar e/ou separar espermatozóides portadores do X e do Y, baseadas nas suas diferenças físicas*

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

* Adaptado de Pegoraro e Hossepian de Lima (2001).

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

Shettles (1970) medindo o pH do plasma seminal e do muco cervical confirmou essa tendência, e ainda sugeriu que duchas vaginais ácidas (com ácido acético) ou básicas (com carbonato de sódio) prévias ao coito podiam alterar a relação de 50:50 em um ou outro sentido. Em coelhos, Wakim (1972) demonstrou que se o pH vaginal na hora do coito era levemente ácido (6,5 a 7,3), a descendência era predominantemente feminina, enquanto que se era alcalino (7,5 a 8,3), predominavam filhotes machos.

Van Munster *et al.* (1999) com auxílio de um microscópio com contraste e interferência diferencial, conseguiram diferenciar, em bovinos espermatozóides X dos Y mediante a mensuração do volume da cabeça destes. Essa diferença entre o volume da

cabeça do espermatozóide X e Y relacionou-se à diferença existente entre o conteúdo de DNA presente nas duas populações de espermatozoides.

De acordo com Pegoraro e Hossepián de Lima (2001) os trabalhos tentando a separação eletroforética dos espermatozoides baseadas nas diferenças de carga elétrica (negativa) são também dos mais antigos. Alguns experimentos foram conduzidos para determinar se as populações separadas por eletroforese produziram progênes com a proporção sexual alterada, após inseminação artificial. Não se obteve desvio significativo da proporção sexual na progênie de leporinos (GORDON, 1957). Com modificações do método eletroforético obtiveram-se resultados contrastantes na espécie humana e em bovinos (AMANN, 1989). Posteriormente, obteve-se o nascimento médio de 85% de machos e 73% de fêmeas, utilizando para inseminação artificial, duas frações separadas por eletroforese.

Os estudos relacionando o pH do sêmen à proporção sexual da descendência, iniciaram-se na década dos trinta, quando foi sugerido que os espermatozoides X eram favorecidos em um meio vaginal ácido, e os espermatozoides Y no plasma seminal meio alcalino (PEGORARO & HOSSEPIAN DE LIMA, 2001).

Para esclarecer esta dúvida, Ishijima *et al.* (1991) mediram o potencial zeta dos espermatozoides X ou Y por espectrofotometria e separaram as duas populações por eletroforese, verificando a acuidade do método por coloração com quinacrina mustarda. O potencial zeta na fração contendo mais de 80% de espermatozoides Y e 95% de espermatozoides X foi de aproximadamente -16 e -20 milivolts, respectivamente. Comprovou-se que os espermatozoides X tinham carga elétrica mais negativa e, portanto, mobilidade eletroforética maior.

Essa técnica procura a separação dos espermatozoides X e Y pelas diferenças de velocidade de migração ao pólo positivo num campo elétrico (eletroforese). Inseminando coelhas com espermatozoides que tinham migrado ao pólo positivo, Gordon (1957) conseguiu produzir 62% de fêmeas, sugerindo que a carga elétrica negativa na superfície espermática era maior nas células com cromossomo sexual X.

Os estudos sobre diferenças na velocidade de migração consistem, basicamente, em depositar a amostra de espermatozoides na superfície de tubos ou pipetas contendo meios viscosos, chamadas de colunas, recuperando depois as células do fundo. Ao recuperar

espermatozóides submetidos a concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA) obtiveram resultados discordantes (EVANS *et al.*, 1975; ROSS *et al.*, 1975).

. Este método também foi testado em outras espécies animais. Em bovinos (BEAL *et al.*, 1984; PINKEL *et al.*, 1985) e coelhos (ZAVOS, 1983), não foi possível desviar a proporção sexual após o tratamento dos espermatozóides com esta técnica.

White *et al.*, 1984, (citados por WINDSOR *et al.*, 1993) relataram um desvio significativo na proporção do sexo em ovinos, em um o número limitado de ovelhas. Em 1987, quando Evans *et al.* (citados por WINDSOR *et al.*, 1993) repetiram este experimento em larga escala (196 ovelhas foram inseminadas com espermatozóides da fração inferior de espermatozóides e 199 foram inseminadas com a fração superior) a proporção sexual (58% de machos) foi desviada significativamente com a utilização dos espermatozóides da fração inferior. O mesmo não aconteceu com a utilização da fração superior (55%). Em coelhos, Windsor *et al.* (1993) também não observaram desvio significativo da proporção sexual, após submeterem os espermatozóides a este tratamento e verificar os resultados por citometria de fluxo.

A maior parte das técnicas de separação física descritas foi relegada por apresentarem limitações importantes, tais como efeitos deletérios sobre os espermatozóides, pouca precisão, ou pouca repetibilidade (JOHNSON, 1988; BRADLEY, 1989; JAFAR & FLINT, 1996; PEGORARO e HOSSEPIAN DE LIMA, 2001).

Vários métodos de separação dos espermatozóides X e Y, foram testados ao longo do tempo baseando-se na detecção de diferenças químicas e físicas existentes entre estas duas populações como demonstrado a seguir no Quadro 01. Entretanto, nem todos os métodos propostos foram eficientes na separação dos espermatozóides X ou Y. Na maioria das tentativas, as diferenças fenotípicas entre os espermatozóides portadores dos cromossomos X ou do Y não foram evidenciadas com precisão, ou não se obteve desvio significativo da proporção sexual quando o sêmen tratado foi usado para inseminação artificial (ALMEIDA & ALVAREZ, 2003). Além disso, no caso de alguns tratamentos ocorreu diminuição da capacidade de fecundação dos espermatozóides, embora a separação tenha ocorrido com acuidade de 80%. Diante desses resultados métodos baseados em manejo nutricional, no tempo da IA em relação a ovulação, bem com em características morfológicas do testículo (hipótese deste estudo) continuam a ser consideradas e pesquisadas.

2.5.2.1 Citometria de Fluxo

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

Os sistemas de fluxo (citômetros), na qual se baseia a citometria de fluxo, foram comercializados a partir dos anos 70 com a função inicial de pesquisas médicas, diagnósticos relacionados às células sanguíneas e utilização em outras variadas suspensões celulares, (JOHNSON 1992). Os primeiros trabalhos medindo diferenças na quantidade de DNA utilizando um fluorocitômetro de fluxo foram realizados na década dos 80 (PINKEL *et al.*, 1982). Um aparelho capaz de medir diferenças de volume entre células, chamado de citômetro de fluxo (FULWALER, 1965), foi modificado para medir diferenças celulares de fluorescência.

A partir do rápido desenvolvimento dos citômetros, em conjunção com a revolução do computador, nos anos 80, a citometria tornou-se suficientemente precisa para detectar as diferenças entre os espermatozóides X e Y (PINKEL *et al.* 1982; JOHNSON 1992). Esta diferença varia conforme a espécie, sendo a maior diferença encontrada no roedor *Microtus oregoni*, que é de 12,5% e a menor no homem, com 2,5% (MORUZZI 1979; JOHNSON 1995; JOHNSON 2000).

O primeiro trabalho que permitiu a separação de espermatozóides viáveis inteiros, por esse método, foi realizado em coelhos por JOHNSON *et al.* (1989). Usando IA intra-uterina, os espermatozóides sexados X produziram 94% de fêmeas, e os considerados Y, 81% de filhotes machos. Em suínos, a exatidão foi de 74% para fêmeas e 68% para machos, após IA intra-tubárica (JOHNSON, 1991). Os primeiros bovinos “sexados” usando a CF na separação do sêmen, foram obtidos por CRAN *et al.* (1993 e 1995), usando espermatozóides Y na FIV e posterior transferência dos embriões em receptoras, tendo obtido 90% de bezerros machos. Em 1995 nasceu o primeiro ser humano concebido usando sêmen sexado pela CF, que foi do sexo masculino, conforme previsto (FUGGER, 1999), e

em 1996 o primeiro cordeiro (CATT *et al.*, 1996). Entre 1996 e 1998, duas modificações foram incorporadas ao método de CF, permitindo aumentar a velocidade da passagem celular e o correto posicionamento dos espermatozóides.

Os espermatozóides sexados por este método, além de serem viáveis, podem ser congelados/descongelados com fertilidade aceitável. Pela sua alta exatidão, essa técnica é usada como método de validação para outras técnicas de separação. Em contrapartida, a CF apresenta ainda o inconveniente de precisar de um equipamento de custo relativamente alto, ter baixa eficiência e ser relativamente lenta. Isto faz com que seu produto (sêmen “sexado”) tenha um custo de mercado considerado elevado. Por esse motivo, seu uso fica restrito à inseminação *in vitro* de oócitos, os quais requerem um reduzido número de espermatozóides (caso de ICSI e FIV). Outro problema da técnica de CF é que pode ser potencialmente tóxica. Os possíveis efeitos deletérios inerentes à técnica (mecânicos, coloração vital do DNA, exposição ao laser) na viabilidade dos espermatozóides são hoje matéria de estudo, visto que, mesmo quando o dano estrutural e a perda de fertilidade não sejam importantes, não pode ser descartada a possibilidade de eventuais efeitos mutagênicos provocados pelo uso do raio laser (ALMEIDA & ALVAREZ, 2003).

2.5.2.2 Hibridização *In Situ* por Fluorescência – FISH

A hibridização *in situ* é uma prova DNA específica que detecta o cromossomo Y no espermatozóide, hoje, denominada FISH, do inglês Fluorescence *In Situ* Hybridization, (KOBAYASHI *et al.* 1999).

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente, tal diferença é evidenciada utilizando-se um corante fluorescente, em que os espermatozóides portadores dos cromossomos X ou Y são separados de acordo com a intensidade de fluorescência (JOHNSON, 1994).

A coloração para visualização da cromatina Y, (BARLOW & VOSA 1970; SUMNER *et al.*, 1976), possível na espécie humana, não teve o mesmo sucesso quando aplicada a outras espécies, embora exista um relato que sugere sua presença em bovinos (HAGELE *et al.*, 1984).

OGAWA *et al.* (1988) demonstraram a presença do corpúsculo F (corpúsculo fluorescente), pela coloração com Quinacrina Mustarda, em espermatozóides de bovinos, suínos, leporinos, murinos, cães, ratos e humana. Os autores sugeriram que os espermatozóides marcados pelo tratamento corresponderiam àqueles portadores do cromossomo Y. Este método foi desenvolvido para confirmar os resultados de outros métodos de separação de espermatozóides portadores de cromossomos X ou Y. Posteriormente, foram desenvolvidas sondas de DNA específicas do cromossomo Y que permitem a confirmação dos resultados obtidos nas espécies em que a visualização da cromatina Y não é possível (BRADLEY *et al.*, 1989).

Sendo assim, a citogenética molecular representa um enfoque novo que combina elementos da citogenética convencional e as metodologias da biologia molecular. Esse progresso resultou no desenvolvimento do FISH; por definição o mapeamento de um gene por hibridização molecular com uma seqüência clonada, marcada por fluorescência, num cromossomo espalhado em lâmina, desenvolvido em 1980, e os resultados das preparações fazem com que, em microscópio de fluorescência e filtros específicos, tornem fluorescentes regiões marcadas pelas sondas que utilizadas (www.geneticamedica.com.br/servicos/fish.htm), consiste na ligação de sondas (seqüências de DNA) fluorescentes aos genes ou cromossomos alvo complementares.

A marcação cromossomo-específica é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes. Sistemas computadorizados de análise auxiliam a avaliação das preparações citogenéticas. A técnica de FISH vem sendo utilizada, principalmente em humanos e ruminantes permitindo a identificação de seqüências gênicas através do princípio da complementariedade de nucleotídeos do DNA e RNA. Requer o uso de sondas moleculares, podendo ser seqüências completas de genes conhecidos ou fragmentos de DNA, que rastrearão a presença de tal gene no material biológico em teste. Estas sondas devem ser marcadas de alguma forma, para permitir a visualização do híbrido, podendo ser um produto colorido ou que emite luz (quimioluminescente). Existem três tipos de sonda que podem ser utilizadas.

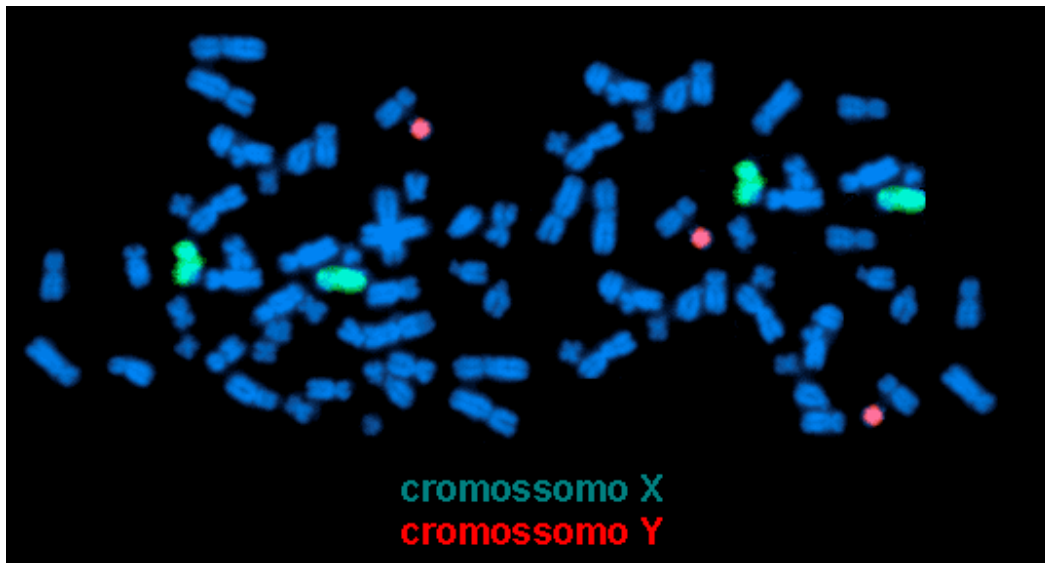


Fig. 01. Sonda painting: sonda específica de várias regiões de um mesmo cromossomo que, utilizadas juntas, dão a impressão de "pintá-lo" inteiro. Essas sondas são utilizadas principalmente para determinar translocações e deleções.

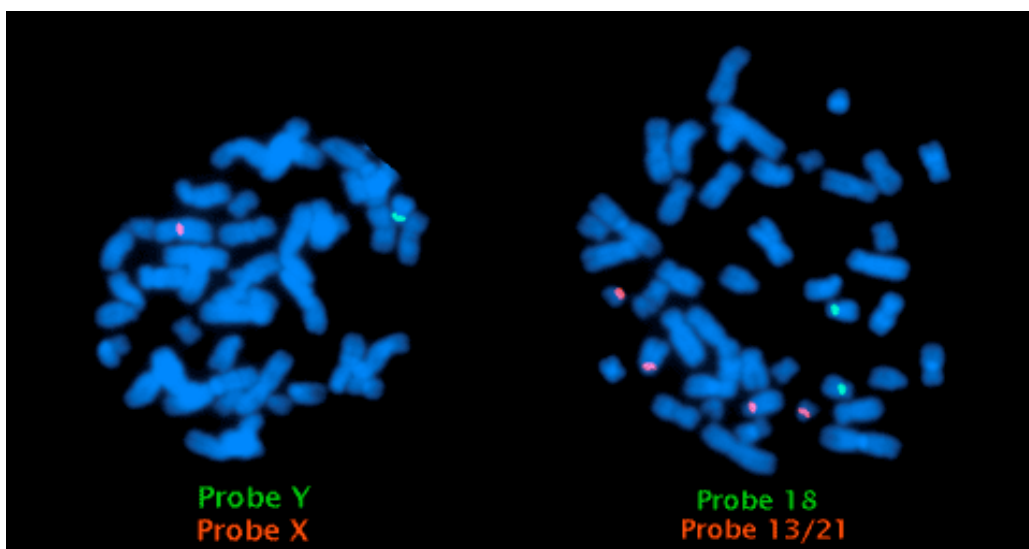


Fig. 02. Sondas alfa satélites: compostas de um DNA de sequência repetida encontrada geralmente na região do centrômero dos cromossomos. Esta sonda por sua composição é usada para determinar aneuploidias.

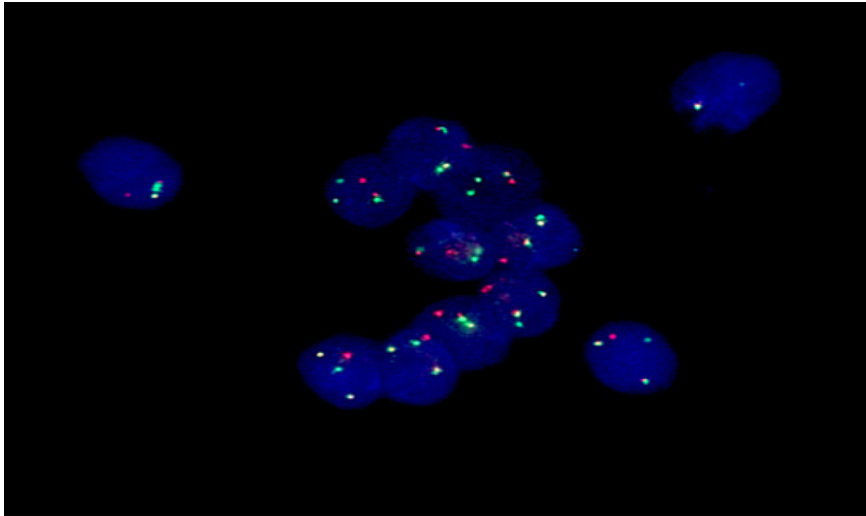


Fig. 03. Sondas de seqüência única: marcam uma região específica do cromossomo, estas sondas são usadas para verificar microdeleções e assim diagnosticar síndromes e anormalidades cromossômicas.

Atualmente, os conhecimentos a despeito dos aspectos funcionais, mecanismos regulatórios e vias de sinalização dos diferentes genes estão sendo possíveis através do avanço da biologia celular e molecular. O advento dos estudos com DNA permitiu a clonagem e caracterização de genes específicos. A identificação dos espermatozoides portadores do complemento cromossômico sexual masculino (Y) e do feminino (X) constitui uma alternativa extremamente interessante para a validação dos métodos de sexagem de espermatozoides.

3. CAPÍTULO ÚNICO

PROPORÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PORTADORES DE CROMOSSOMOS X OU Y EM CAPRINOS E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TESTOSTERONA, EM CAPRINOS SEGUNDO A CONFORMAÇÃO ESCROTAL

SILVA, J.M.¹ ; VIEIRA, R.J.²

¹Pós-graduanda do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI)

²Prof. Dr. do Curso do Mestrado em Ciência Animal da UFPI –
rvieira@ufpi.br

3.1. RESUMO

Correlações significativas têm sido encontradas entre a concentração sanguínea de testosterona e vários parâmetros reprodutivos, podendo interferir na proporção de espermatozóides contendo cromossomo Y. Este trabalho teve por objetivo avaliar a proporção de cromossomos X e Y em caprinos de acordo com a conformação escrotal, verificando informações do efeito das concentrações séricas de testosterona sobre a proporção sexual. Foram utilizados 12 reprodutores, sem raça definida, oriundos de regiões do estado do Piauí, divididos em três grupos de quatro animais: o grupo GI (contendo

escroto sem bipartição), o GII (caprinos com escroto bipartido até 50% do comprimento testicular) e o GIII (caprinos com escroto bipartido acima de 50% do comprimento testicular) levando-se em consideração a conformação escrotal, de acordo com o que foi proposto por Almeida (2003) em adaptação à classificação realizada por Nunes et al. (1984), que trabalharam com seis níveis de partição. Para a determinação das concentrações séricas de testosterona, coletou-se sangue da veia jugular, sendo a mensuração realizada através do radioimunoensaio (RIA) em fase sólida. Após a colheita do sêmen, o volume foi determinado no próprio tubo graduado da colheita. As avaliações da motilidade e vigor foram realizadas imediatamente para posterior diluição e congelamento do ejaculado. Uma alíquota de cada amostra foi conservada em solução formol-salina para posterior determinação da concentração espermática, em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscopia óptica convencional. Foram envasadas palhetas de 0,5mL, sendo identificadas com o número do animal, data da coleta, vedadas com álcool polivinílico e submetidas, em seguida a técnicas de criopreservação. Para determinação da proporção de espermatozoides portadores de cromossomo Y foi utilizada a técnica de Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH). Os resultados mostraram que houve uma variação na proporção de espermatozoides contendo cromossomos Y entre os grupos, mostrando diferença significativa ($p < 0,05$), não sendo observado correlação significativa entre os níveis de testosterona e proporção de espermatozoides contendo cromossomos X ou Y.

Palavras-chave: Cromossomo X ou Y, FISH, sêmen, caprino.

3.2. INTRODUÇÃO

A determinação do sexo é definida como uma série de etapas ordenadas que se inicia com o estabelecimento do sexo genético, quando o oócito é fecundado por um espermatozoide portador do cromossomo X ou do cromossomo Y originando, respectivamente, um embrião geneticamente do sexo feminino (XX) ou masculino (XY). O sexo genético é a determinante para que a gônada indiferenciada organize-se como testículo ou ovário (sexo gonadal), estabelecendo-se, a partir da diferenciação gonadal e do seu funcionamento endócrino, o sexo fenotípico. O dimorfismo sexual dos mamíferos tem

sua base genética na constituição do par de cromossomos sexuais XX ou XY, na qual a presença ou ausência de seqüências do cromossomo Y induz a determinação primária do sexo (gonadogênese) e que, por sua vez induz as outras etapas da diferenciação sexual (HAFEZ, 2003).

A testosterona e o hormônio folículo estimulante (FSH) agem através das células dos túbulos seminíferos para estimular a espermatogênese. Altas concentrações de testosterona em fluidos que envolvem os túbulos seminíferos (100 a 300 vezes maior do que no plasma periférico) são aparentemente essenciais para uma espermatogênese normal, podendo interferir na proporção de espermatozóides X ou Y durante a espermatogênese (BEARDEN & FUQUAY, 1992).

Nos mamíferos a proporção natural de nascimentos de um determinado sexo é da ordem de 50% (SEIDEL, 1999; SILVERSIDES, 2001).

A possibilidade de escolha do sexo dos descendentes foi sempre uma questão desafiadora. Há muitos anos que se busca entender e desenvolver tecnologias que possibilitem direcionar-se a sexagem de sêmen nos animais devido ao impacto econômico considerando os ganhos genéticos com a redução de tempo e seleção de plantéis (ALMEIDA & ALVAREZ, 2003).

A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e até o momento é a única diferença estabelecida e validada cientificamente, tal diferença é evidenciada utilizando-se um corante fluorescente, onde os espermatozóides portadores dos cromossomos X ou Y são separados de acordo com a intensidade de fluorescência (JOHNSON, 1999).

Fatores, tais como, partição do escroto, podem estar envolvidos no desvio da proporção sexual (NUNES *et. al.*, 1986). A proporção de espermatozóides portadores de cromossomos X ou Y associada à múltiplas ovulações e criopreservação de sêmen e embriões reduziria os custos otimizando o sistema de produção. Em animais cuja conformação escrotal difere, o “escroto” se divide proporcionando maior aeração e melhor termorregulação e, em conseqüência, melhor libido e qualidade de sêmen o que, permite supor maior taxa de fertilidade, podendo influenciar na proporção sexual das crias. O presente trabalho teve como objetivo é verificar a proporção de espermatozóides portadores

de cromossomos X ou Y em caprinos e concentrações séricas de testosterona, em caprinos segundo a conformação escrotal.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Local do experimento, animais e formação dos grupos experimentais

Esta pesquisa foi realizada no Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), em de Teresina - PI, latitude 05°05'21" sul, longitude 42°48'07" oeste, altitude 72m, com radiação solar mensal média de 676cal. cm² / dia e umidade relativa de 65%. Foram utilizados 12 machos caprinos, sem raça definida (SRD), oriundos de diferentes regiões do estado do Piauí. Os animais foram separados de acordo com a conformação escrotal em três grupos de quatro caprinos, segundo o proposto por Almeida (2003). O grupo I (GI), composto de animais sem bipartição escrotal, o grupo II (GII), de animais que apresentavam escroto bipartido até 50% do comprimento testicular e o grupo III (GIII), de animais cujo escroto apresentava bipartição superior a 50% do comprimento testicular (Fig. 01).

Os animais foram mantidos no aprisco experimental do CCA , em piquetes com sombreamento natural e pasto nativo (Anexo 01), sendo a alimentação complementada com ração comercial (FRI-Borrego Engorda: 1,3% de cálcio, 2,5% de extrato etéreo, 0,3% de fósforo, 10% de fibra, 12% de minerais, 16% de proteína, 12% de umidade e 70% de NDT) na proporção de 1% do peso vivo por dia, fracionada em duas refeições, tendo ainda sal mineral (FRI-Phos Ovicapri) e água limpa *ad libitum*.



Figura 01. Fotografia da região escrotal de caprinos dos diferentes grupos, sendo GI, animais sem bipartição escrotal; GII, animais com bipartição escrotal de até 50% do comprimento testicular; e GIII, animais com bipartição escrotal superior a 50% do comprimento testicular.

3.3.2. Colheita, avaliação e congelamento do sêmen

Foram realizadas cinco colheitas de cada animal, através de vagina artificial (MIES FILHO, 1987), utilizando-se como fator estimulante uma fêmea em estro induzido ou natural, devidamente contida. As avaliações da motilidade (%), do vigor (escala de 0 a 5) e da concentração espermática (sptz/mm^3) foram realizadas de acordo com as normas do CBRA(1998).

Uma vez avaliada a amostra seminal, os ejaculados foram distribuídos em tubos contendo diluidor a base de Tris preparado com crioprotetor glicerol. Foram envasadas palhetas de 0,5mL, sendo identificadas quanto ao animal, partida e sendo vedadas com álcool polivinílico, sendo submetidas, à técnica de criopreservação automatizada, sendo utilizado um aparelho de fabricação nacional (Tetakon, TK 3000), equipado com uma unidade geradora, a qual estão acopladas um porta-palhetas de aço inox e uma caixa térmica plástica.

As palhetas permaneceram no porta-palhetas até atingirem a temperatura de 5°C , sendo logo após transferidas para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, permanecendo até atingir a temperatura de -120°C . Posteriormente removidas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

O aparelho foi programado pelo fabricante para seguir uma curva de resfriamento de 0,25°C/ minuto até 5° C, com duração de aproximadamente uma 1 hora e 15 minutos e uma curva de congelação de – 15°C/ minuto de 5°C até – 80°C, após 10°C /minuto até – 120°C.

3.3.3 Análise por Fluorescência com hibridização *in situ*

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, sendo realizada as avaliações de motilidade e vigor. Uma alíquota de 1mL foi colocada em um tubo de 15 mL e centrifugada em 9 mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) e centrifugado durante cinco minutos a 475 G. Após duas lavagens o sedimento coletado foi resuspendido em 1 mL de PBS com 6 mM de EDTA para obtenção de uma concentração final de 20 a 25 x 10⁸ células/mL. Foram feitos dois esfregaços por partida com os espermatozóides lavados, secos overnight à temperatura ambiente.

Para descondensação da cabeça do espermatozóide, as lâminas foram lavadas em Solução Salina de Citrato Padrão (SSC; Sigma Chemical, St. Louis, MO) previamente aquecida em banho-maria a temperatura de 73° C durante 30 minutos e levadas para estufa por cinco minutos em 1 M de Tris, com pH 9.5, contendo 25 mM de dithiothreitol (DTT; Sigma). Após a descondensação, as lâminas foram lavadas novamente em SSC, e logo após em PPS. Para desidratação foi utilizada uma série de etanol (70%, 85% e 100%), deixando secar a temperatura ambiente. A Hibridização por Fluorescência *in Situ* (FISH) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Kobayashi *et al.*(1999).

3.3.4 Concentração de testosterona

Amostras sangüíneas foram colhidas pela manhã, por punção da jugular com vacountainer, obtendo-se 10ml de sangue acondicionados em frasco estéril sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 1500G durante 10 minutos para obtenção de soro, que foi mantido sob congelação (-20°C) para posterior dosagem hormonal.

As dosagens de testosterona foram realizadas pelo método de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se reagente comercial, com o hormônio sendo marcado com I¹²⁵ (traçador radioativo). A radioatividade foi medida por contador automático para determinação da curva padrão e da concentração das amostras.

3.3.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (GI, GII, GIII). Os valores encontrados foram submetidos ao teste de diferença de médias “t” de Student, no nível de 5 % de significância para proporção de espermatozóides portadores cromossomo Y (4 animais x 5 repetições) e para concentração de testosterona (4 animais x 15 repetições). Foi utilizado o teste de correlação de Pearson ($\alpha = 0,05$) para observar a influência das concentrações de testosterona nos espermatozóides portadores de cromossomos Y.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação dos espermatozóides portadores do cromossomo Y realizada por hibridização *in situ*, usando seqüências específicas do cromossomo Y, mostrou que houve uma variação na proporção de espermatozóides contendo cromossomos Y entre os grupos, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pesquisados, sendo que esta proporção média para GI foi de 49,3%, para o GII, 50,7% e para GIII, 50,1%. Estes resultados não confirmaram as informações dos caprinocultores de que reprodutores com escroto bipartido induzem a uma maior proporção de fêmeas “*in vivo*” (Tabela 01).

O mesmo foi observado por Silva *et al.*, (1986) ao estudar caprinos da raça Moxotó, com escroto bipartido e não bipartido, onde houve uma proporção maior de nascimentos de crias do sexo macho do que de fêmeas, independente da morfologia escrotal, porém fatores tais como o pH vaginal podem ter desviado a proporção sexual dos nascimentos, pois Shettles (1970) medindo o pH do plasma seminal e do muco cervical confirmou essa tendência, e ainda sugeriu que duchas vaginais ácidas (com ácido acético) ou básicas (com carbonato de sódio) prévias ao coito podiam alterar a relação de 50:50 em um ou outro sentido. Em coelhos Wakim, (1972) demonstrou que se o pH vaginal na hora do coito era levemente ácido (de 6,5 a 7,3), a descendência era predominantemente feminina, enquanto que se era alcalino (7,5 a 8,3), predominavam os filhotes machos.

Com relação a avaliação do cromossomo Y em caprinos, a literatura consultada não faz referências à variações em função da conformação escrotal. Pegoraro e Hossepian de

Lima (2001), afirmaram que os espermatozóides X são favorecidos pelo meio vaginal ácido e os espermatozóides Y no plasma seminal pelo meio alcalino.

Outro fator que poderia interferir na proporção sexual da progênie são as diferenças na velocidade de migração. Ericsson *et al.* (1973) ao depositarem amostras de espermatozóides na superfícies de tubos contendo meios viscosos, recuperando depois as células do fundo, constataram que 85% foram positivos à coloração de quinacrina (que cora especificamente a parte do cromossomo Y), ou seja, machos. Contudo, trabalhos posteriores utilizando a mesma metodologia de colunas de BSA, obtiveram resultados discordantes (EVANS *et al.*, 1975; ROSS *et al.*, 1975).

White *et al.* 1984, (citados por WINDSOR *et al.*, 1993) relataram um desvio significativo na proporção do sexo em ovinos, em um o número limitado de ovelhas. Em 1987, quando Evans *et al.* (citados por WINDSOR *et al.*, 1993) realizaram o experimento em larga escala (196 ovelhas foram inseminadas com espermatozóides da fração inferior de espermatozóides e 199 foram inseminadas com a fração superior) a proporção sexual (58% de machos) desviou significativamente com a utilização dos espermatozóides da fração inferior. O mesmo não aconteceu com a utilização da fração superior (55%). Em coelhos, Windsor *et al.* (1993) também não observaram desvio significativo da proporção sexual, após submeterem os espermatozóides a este tratamento e verificarem os resultados por citometria de fluxo.

Já foi constatado que os espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y apresentam diferenças na habilidade em fecundar os oócitos, talvez devido a diferenças na motilidade, tempo de viabilidade ou nos processos de capacitação e reação do acrossoma (GUTIÉRREZ-ADÁN, 1999.). Alguns produtos gênicos ou proteínas carregados pelo espermatozóide portador do cromossomo Y e liberados no momento da fecundação, também podem determinar a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os sexos. Tais produtos gênicos poderiam induzir a transcrição de outros genes, exclusivamente em embriões machos (RAY, 1995).

Segundo Gutierrez-Adan, (2001) apesar da proporção esperada em uma população para machos e fêmeas ser de 1:1, trabalhos demonstraram uma diferença na velocidade de desenvolvimento entre os dois sexos. Sabe-se que os embriões do sexo masculino, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, desenvolvem-se rapidamente em diversas espécies, o que poderia estar relacionado à alta tensão de oxigênio, induzindo a produção de radicais livres

de oxigênio, resultantes das reações XOD-HXT, mesmo na ausência de glicose (RIEGER, 1992). Estes radicais poderiam ser suficientes para determinar o estresse oxidativo que aceleraria o desenvolvimento dos embriões machos, o qual seria exacerbado pelo incremento das reações XOD-HXT, na presença de glicose. Nos embriões fêmeas, a presença de glicose levaria à super-expressão das enzimas G6PDH e HPRT, ligadas ao cromossomo X, reduzindo a sua produção de radicais de oxigênio até níveis anormalmente baixos, talvez até atrasando o seu desenvolvimento (PEGORARO, *et.al.*,2002).

Quanto as concentrações de testosterona e proporção de espermatozóides portadores de cromossomos Y. Neste trabalho foi observada uma diferença significativa entre os grupos estudados, observou-se superioridade significativa, no que diz respeito as concentrações de testosterona, do grupo GIII em relação aos demais grupos (Tabela 02). Considerando a proporção de espermatozóides portadores de cromossomo Y, o grupo GII apresentou-se superior quando comparado aos demais grupos, não sendo observada correlação entre as variáveis estudadas .

Machado Júnior (2006) estudando outros aspectos no mesmos grupos de animais, observou que o grupo GIII foi o que apresentou maiores valores de biometria, tanto do escroto quanto do testículo. Em relação ao estudo do comportamento sexual, verificou que os grupos GII e GIII mostraram melhor desempenho.

Correlações positivas entre testosterona e libido e o turbilhonamento espermático foram observadas por Almeida (2003). Essa correlação é também corroborada por Dufour *et al.*, (1984), que observaram correlação entre a testosterona plasmática e libido. Numerosos fatores estão associados à variação da proporção dos sexos ao nascimento nos animais de interesse zootécnico, inclusive a concentração de gonadotrofinas e esteróides (KRACKOW, 1997), os animais do GIII apresentaram maior nível de testosterona e no estudo de Machado (2006) apresentaram melhor libido, concordando com o observado por Dufour *et al.*, (1984).

Na espécie humana, homens que sofreram tratamentos com gonadotrofinas e metil-testosterona geraram em média 65% de meninos, provavelmente, devido ao aumento das concentrações de testosterona.

Os resultados obtidos permitiram concluir que animais com bipartição escrotal apresentaram maior número de espermatozóides portando cromossomo Y e maiores níveis séricos de testosterona, entretanto não observou-se correlação entre estas variáveis.

Caracterização genética desses animais podem oferecer informações importantes para a tomada de decisões racionais para a melhoria e desenvolvimento de programas de melhoramento e seleção.

TABELA 01. Porcentagem de espermatozoides Y, em caprinos SRD, segundo conformação escrotal, média de cinco repetições (5 x 4 animais). Teresina-PI, abril de 2006.

Grupos	Número de repetições = n	% de espermatozoides portadores de cromossomo Y	Coefficiente de variação
GI	20	49,3 [±] 2,52 ^a	0,05
GII	20	50,7 [±] 2,58 ^b	0,05
GIII	20	50,1 [±] 3,20 ^c	0,06

Letras diferentes dentro da mesma coluna diferem estatisticamente (p < 0,05).

TABELA 02. Concentração sérica de testosterona, em caprinos SRD, segundo conformação escrotal. Teresina-PI, abril de 2006.

Grupos	Número de repetições = n	Concentração sérica de testosterona ng/mL	Coefficiente de variação
GI	15	32,6 [±] 5,14 ^a	0,1
GII	15	95,5 [±] 4,89 ^b	0,5
GIII	15	91,4 [±] 5,49 ^c	0,6

*Letras diferentes dentro da mesma coluna são diferem estatisticamente (p < 0,05).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, G.P. e ALVAREZ, R.H., Métodos de separação de espermatozóides para escolha do sexo dos animais domésticos:Revisão de literatura. **B.Indústr.anim.**, N. Odessa,v.60, p.107-15, 2003.

ALMEIDA, M.M. **Vascularização arterial testicular e escrotal de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo grau de divisão do escroto, e relação com parâmetros reprodutivos.** Teresina, 2003. 96p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

AVERY, B.; JORGENSEN, C. B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 32, p. 265-70, 2001.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. of Ferti.**, v. 106, p. 169-72, 1996.

CBRA – **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 ed. 1998.

DUFOUR, J.J.; FAHMY, M.H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **J. An.Sci.**, v.58, n.2, p.416-22, 1984.

ERICSSON, R.J., LANGEVIN, C.N., NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, London, v.246, p.421-4, 1973.

EVANS, J.M., DOUGLAS, T.A., RENTON, J.P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. **Nature**, London, v.253, p.352-4, 1975.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Zygote**, v. 7, p. 37-43, 1999.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LORNERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 55, p. 1117-26, 2001.

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1323-41, 1999.

KOBAYASHI, J.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; UMEZU, M.; SATO, E. Fluorescence in situ hybridization with Y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa. **Theriogenol.**, v. 52, n. 6, p. 1043-54, 1999.

MACHADO JR, A.A. **Influência da morfologia escrotal sobre a termorregulação, a biometria escrot-testicular e o comportamento sexual de caprinos nos períodos seco e chuvoso do Estado do Piauí.** Teresina, 2005. 84p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed., v.1, Porto Alegre: Sulina, p.364, 1987.

NUNES, J.F.; VIEIRA, G.S.; SILVA, A.E.F.D.; PONCE DE LEON, F.A.; LIMA, F.A.M. **Características espermáticas de caprinos moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos, p. 11, 1984 (Circ técn, 6).

PEGORARO, L. M. C. et al. Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 57, p. 751, 2002.

PEGORARO, L.M.C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Selección del sexo en mamíferos. In: PALMA, G.A. (Ed.). **Biología de la Reproducción**. Balcarce, Argentina: INTA, 2001. p. 317-51.

RAY, P.F. et al. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following *in vitro* fertilization. **Journal Reproduction of Fertility**, v. 104, p. 165-171, 1995.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenol.**, v. 37, p. 75-93, 1992.

ROSS, A., ROBINSON, J.A., EVANS, H.J. Failure to confirm separation of X- and Y-bearing human sperm using BSA gradients. **Nature**, London, v.253, p.354-5, 1975.

SEIDEL, G.E. Jr. Sexing mammalian sperm and embryos - State of the art. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.52, p.1273-80, 1999.

SHETTLES, L.B. Factors influencing sex ratios. **J. Gynecol.Obstet.**, v.8, p.643-50, 1970.

SILVERSIDES, D.W. Genetic manipulation of Sex differentiation and phenotype in domestic animals. **Theriogenol.**, Los Altos, v.55, p.51-63, 2001.

SILVA, A.E.F.D.; NUNES, J.F.; MELO, F.A. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen e seus efeitos na fertilidade de caprinos. **A Hora Veterinária**, Ano 5, n.29, 1986.

TAYLOR, C.S., MOORE, A.J., THIESSEN, R.B. Efficiency of food utilization in traditional and sexcontrolled systems of beef production. **Anim. Prod.Edinburgh**, v.40, p.401-440, 1985.

WAKIM, P.E. Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. **J. Am. Osteopath. Ass.**, v.72, p.173-79,1972.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Mol. Reprod. Develop**, v. 5, p. 155-71, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram concluir que animais com bipartição apresentam maior número de espermatozoides portando cromossomo Y e maiores níveis séricos de testosterona, não havendo correlação entre ambos, no entanto, pesquisas futuras se fazem necessárias para elucidar completamente todos os fatores que podem interferir desviando assim a proporção sexual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G.P. e ALVAREZ, R.H., Métodos de separação de espermatozóides para escolha do sexo dos animais domésticos:Revisão de literatura. **B.Indústr.anim.**, N. Odessa,v.60, p.107-15, 2003.

ALMEIDA, M.M. **Vascularização arterial testicular e escrotal de caprinos nativos do Estado do Piauí, segundo grau de divisão do escroto, e relação com parâmetros reprodutivos.** Teresina, 2003. 96p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

AMANN, R. P. Treatment of sperm to determine sex. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 4961, 1989.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and maturation: a perspective. **Reprod. Fert. Devel.**, Collingfwood, v.5, p.361-81, 1993.

ARAÚJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F.C.; PIMENTEL, J.C.M. Estágio atual e perspectivas da ovinocultura. **In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA TROPICAL BRASILEIRA**, 1. 1994, Sobral. **Anais** Sobral: Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, p.77-100, 1994.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez le ovins et les caprins**. INRA. Nouzilly, p.231, 1993.

BARLOW, P.; VOSA, C. G. The Y chromosome in human spermatozoa. **Nature**, v. 226, p. 961-2, 1970.

BATISTA, M., PRATS, N., CALERO, P., GONZÁLEZ, F., CABRERA, F., MEDRANO, A., GRACIA, A. Sêmen characteristics and plasma levels of testosterone after bilateral vasectomy in buck. **Reprod. Dom. Anim.** v. 37, p. 357 – 58, 2002.

BEAL, W. E.; WHITE, L. M.; GARNER, D. L. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1432-6, 1984.

BLECHER, S. R.; HOWIE, S. L.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1309-21, 1999.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **An. Reprod. Sci.**, v.65, p. 75 – 88, 2001.

BORQUE, C.; VÁSQUEZ, I.; SAGÜEZ, A. et al., Influence of photoperiod in biochemical tracers of semen. In: ANN MEET OF THE EAAP, v.2, p.273, 1993..

BRADLEY, M.P. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.72, p.3372-3380, 1989.

CBRA – **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 ed. 1998.

CAVALCANTE, T.V. Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças Bôer e Alpina durante estações reprodutivas e não reprodutivas. Jaboticabal, 2003 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP-Jaboticabal.

CHANDLER, J. E.; WILSON, M. P.; CANAL, A. M.; STEINHOLT-CHENEVENT, H. C. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenol.**, v. 52, n. 6, p. 1021-34, 1999.

COLAS, G.; LEFEBVRE, J.; GUÉRIN, J. Etude de la transmission père-fils des variations saisonnières du diamètre testiculaire et du pourcentage de spermatoïdes anormaux chez Lè bélier Ile-France: 1. Filnés em février. **Reprod. Nutr. Develop.**, v.30, p. 589-603, 1990.

CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., MILLER, N.G. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. **Vet.Rec.**,v.132, p.40-41, 1993.

CRAN, D. G.; JOHNSON. L. A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, v. 136, n. 19, p. 495-496, 1995.

CATT, S. L.; CATT, J. W.; GOMEZ, M. C.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Birth of male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. **Veterinary Record**, v. 139, n. 20, p. 494-5, 1996.

DUFOUR, J.J.; FAHMY, M.H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterona concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **J. An.Sci.**, v.58, n.2, p.416-22, 1984.

ELOY, A.M.X.; ROSA, J.S., Perfis plasmáticos de testosterona durante a puberdade de machos caprinos da raça moxotó. **Pesq. Agrope. Brás.**, v.33, n.10, p.1645-52, 1998.

EVANS, J.M., DOUGLAS, T.A., RENTON, J.P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm . **Nature**, London, v.253, p.352-354, 1975.

Food and Agriculture Organization – FAO. **Rebanho caprino mundial**. Disponível em <http://www.fao.org>> Acesso: 04 de março de 2006.

FORD, J.J.; SCHANBACHER, B.D. Luteinizing hormone secretion and female lordosis behavior in male pigs. **Endocrinology**, v. 100, 1033 – 38, 1977.

FUENTES, V.O.; FUENTES, P.; GRACIA, A. The effect of naloxone on plasma concentrations of testosterone in male goats. **Small Rumin. Res.**, v.27, p.173-6, 1998.

FUGGER, E.F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-bearing sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1435-1440, 1999.

FULWYLER, M.L. Electronic separation of biological cells by volume. **Science**, London, v.150, p. 910-911, 1965.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA; JOHNSON, L. A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v. 28, p. 312-21, 1983.

GOMES, E.R.; IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y.;VANDEMARK, N.L., Secretion rates chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. **J.Anim.Sci.** v.33 (4), 829-35, 1971.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LORNERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 55, p. 1117-26, 2001.

GORDON, M.J. Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.43, p.913-18, 1957.

HAFEZ, E.S.E.& HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed., São Paulo: Manole, p.530, 2003.

HENDRIKSEN, P.J.M., TIEMAN, M., LENDE, T. Binding of anti-HY monoclonal antibodies to X- and Y- chromosome-bearing porcine and bovine sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v.35, p.189-196, 1993.

HENDRIKSEN, P. J. M WELCH, G. R.; GROOTEGOED, J. A. VAN DER LENDE, T.; JOHNSON. L. A. Comparasion of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. **Mol. Reprod. Develop**, v. 45, n. 3, p. 342-50, 1996.

HENDRIKSEN, P. J. M WELCH, G. R.; GROOTEGOED, J. A. VAN DER LENDE, T.; JOHNSON. L. A. Do X and Y differ in proteins? **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1295-307, 1999.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1421-33, 1999.

HOPPE, P.C., KOO, G.C. Reacting mouse sperm with monoclonal HY antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro. **J. Reprod. Immun.**, v.6, p. 1-9, 1984.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**. 1998. 89p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M., RAMALHO, M.D.T., RODRIGUES, L.H. et al. Separation of X- and Y bearing bovine spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. **Theriogenol.**, v.53, p.480 , 2000. (Abstr.)

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. 2003. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em: 14 de março de 2005.

ISHIJIMA, S.A., OKUNO, M., MOHRI, H. et al. Potential of human X- and Y-bearing sperm. **Int. J.Androl.**,Copenhagen, v. 14, p.340-347, 1991.

JAFAR, S.I., FLINT, A.P.F. Sex selection in mammals: a review. **Theriogenol.**, Los Altos, v.46, p.191-200, 1996.

JOHNSON, L.A. Flow citometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- or Ybearing sperm. **Theriogenol.**, Los Altos, v.29, p.265 , 1988. (Abst.).

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J. P.; HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits: live births X and Y sperm separation by DNA and cell sorting. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 2, p. 199-203, 1989.

JOHNSON, L.A. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. **Reprod. Dom. Anim.**, v.26, p.309-314, 1991.

JOHNSON, L. A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **Journal of Animal Science**, v. 70 (Suppl. 2), p. 8-18, 1992.

JOHNSON, L. A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **Journal of Animal Science**, v. 70 (Supl. 2), p. 8-18, 1994.

JOHNSON, L. A. Sex preselection by flow cytometry separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, n. 4, p. 893-903, 1995.

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1323-41, 1999.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60, p. 93-107, 2000.

KAYA, A.; AKSON, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic of seminal plasma in ram. **Small Rumin. Res.**, v.44, p.153-8, 2002.

KOBAYASHI, J.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; UMEZU, M.; SATO, E. Fluorescence in situ hybridization with Y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa. **Theriogenol.**, v. 52, n. 6, p. 1043-54, 1999.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, B. Production and storage of goat for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.113-141, 2000.

McEVOY, J. D. Alteration of the sex ratio. **Anim. Breed. Abstr.**, v. 60, n. 2, p. 97-111, 1992.

MACDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary endocrinology and reproduction**, 4 ed, Philadelphia, Lea & Febiger, 1989.

MANDIKI, S.N.M.; DERYCKE, G.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. Influence of season and age sexual maturation parameters in Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. 2. Circulating

concentration of follicle stimulation hormone, luteinizing hormone, prolactin and testosterone. **Small Rumin. Res.**, v.28, p.81-8, 1998.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed., v.1, Porto Alegre: Sulina, p.364, 1987.

MOREIRA-FILHO, C.A., RAMALHO, M.D.T., KIRNZENBAUM, M., COTINOT, C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 483, 2000.

MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, n. 2, p. 319, 1979 (Abstr).

NICHOLAS, F.W., SMITT, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Production**, v.36, p.341-353, 1983.

NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: EMBRAPA, 1982. p. 41. (Circular Técnica 5).

NUNES, J.F.; VIEIRA, G.S.; SILVA, A.E.F.D.; PONCE DE LEON, F.A.; LIMA, F.A.M. **Características espermáticas de caprinos moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos, p. 11, 1983 (Circ técn, 6).

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2.ed.Fortaleza. LCR, p.199, 1997.

OGAWA, H.; KUNIEDA, T.; NAKAGIRI, M.; TAKAMI, M.; IDE, H. Cloning bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle. v.10, 1146- 49, 1988.

PEGORARO, L.M.C., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. In: PALMA, G.A. (Ed.). **Biología de la Reproducción**. Balcarce, Argentina: Ediciones INTA, 2001. p. 317-351.

PENFOLD, L. M.; HOLT, C.; HOLT, W. V.; WELCH, G. R.; CRAN, D. G.; JOHNSON, L. A. Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. **Mol. Reprod. Develop**, v. 50, n. 3, p. 323-27, 1998.

PINKEL, D. GLEDHILL, B. L.; LAKE, S; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A. Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "0" chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. **Science**, v. 218, p. 904-906, 1982.

PINKEL, D. GLEDHILL, GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; JOHNSON, L. A. Flow cytometric determination of the proportion of X and Y chromosome bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 5, p. 1303-1307, 1985.

RAMALHO, M.D.T., ALVES, B.C.A., MOREIRA-FILHO, C.A., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Sexing of murine and bovine embryos by development arrest induced by high titer H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 484, 2000.

RAY, P.F. et al. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following *in vitro* fertilization. **J. Reprod. Fertil.**, v. 104, p. 165-71, 1995.

ROCA, A.J.; MARTINEZ, E.; SANCHEZ-VALDERDE, M.A; RUIZ, S.; VASQUEZ, J.M. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. **Theriogenol.**, v.38, p. 115-25, 1992.

ROSS, A., ROBINSON, J.A., EVANS, H.J. Failure to confirm separation of X- and Y-bearing human sperm using BSA gradients. **Nature**, London, v.253, p.354-5, 1975.

SEIDEL, G.E. Jr. , SCHENK, J.L., HERICKOFF, L.A. et al. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenol.**, Los Altos, v.52, p.1407-20, 1999.

SEIDEL, G.E. Jr. Sexing mammalian sperm and embryos - State of the art. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.52, p.1273-80, 1999.

SHETTLES, L.B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. **Fert. Steril.**, Birmingham, v.12, p.502-8, 1961.

SHETTLES, L.B. Factors influencing sex ratios. **J. Gynecol.Obstet.**, v.8, p.643-50, 1970.

SILVA, A.E.F.D.; NUNES, J.F.; MELO, F.A. Influência da morfologia escrotal nas características do sêmen e seus efeitos na fertilidade de caprinos. **A Hora Veterinária**, Ano 5, n.29, 1986.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. **Goat medicine**. Philadelphia, United States of America: Lea & Fediger, p. 620, 1994.

SILVERSIDES, D.W. Genetic manipulation of Sex differentiation and phenotype in domestic animals. **Theriogenol.**, Los Altos, v.55, p.51-63, 2001

SUMNER, A.T., EVANS, H.J., ROBINSON, J.A. A difference in dry mass between the heads of X- and Ybearing human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.48, p.9-15, 1976.

TAYLOR, C.S., MOORE, A.J., THIESSEN, R.B. Efficiency of food utilization in traditional and sexcontrolled systems of beef production. **Anim. Prod.Edinburgh**, v.40, p.401-440, 1985.

TULI, R.K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. **Theriogenol.**, New York, v.38, p. 487-90, 1992.

Van MUNSTER, E. B.; STAP, J.; HOEBE, R. A.; TE MEERMAN, G. J.; ATEN, J. A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations. **Theriogenol.**, v. 52, n. 8, p. 1281-93, 1999.

WAKIM, P.E. Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. **J. Am. Osteopath. Ass.**, v.72, p.173-9, 1972.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 5, p. 155-71, 1993.

ZAVOS, P.M. Preconception sex determination via intravaginal administration of HY antisera in rabbits. **Theriogenol.**, Los Altos, v. 20, p. 235-40, 1983.

ANEXOS



Figura 01. Fotografias representativas das colheitas de sangue, sêmen e congelação do sêmen com aparelho programável automatizado para criopreservação de sêmen (Tetakon – TK 3000). Teresina-PI, abril de 2006.