



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA PROFISSIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

LUIZ CARLOS PINHEIRO MAIA

IMUNOSSEXAGEM E CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM MEIO À BASE
DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102c) NA ESPÉCIE OVINA

FORTALEZA – CEARÁ

2020

LUIZ CARLOS PINHEIRO MAIA

IMUNOSSEXAGEM E CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM MEIO À BASE
DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102c) NA ESPÉCIE OVINA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Maia, Luis Carlos Pinheiro.

IMUNOSSEXAGEM E CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102c) NA ESPÉCIE OVINA [recurso eletrônico] / Luis Carlos Pinheiro Maia. - 2020.

64 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Pós-Dr. Jose Ferreira Nunes.

1. Ovinos. 2. Sexagem. 3. ACP. 4. Sêmen. .
I. Título.

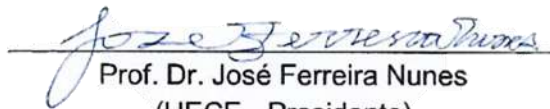
LUIZ CARLOS PINHEIRO MAIA


**IMUNOSSEXAGEM E CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM MEIO À BASE
DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102c) NA ESPÉCIE OVINA**

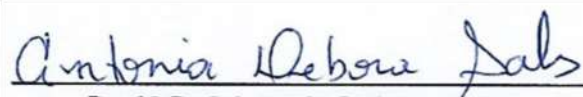
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

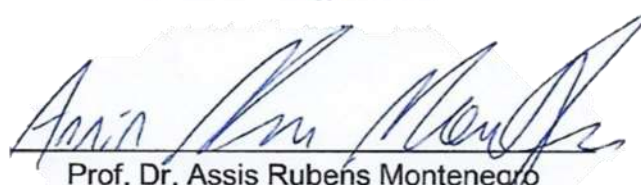
Aprovada em: 17 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Ferreira Nunes
(UECE - Presidente)


Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(UECE - Examinador)


Prof.^a Dr.^a Antonia Debora Sales
(UECE - Examinador)


Prof. Dr. Assis Rubens Montenegro
(UECE - Examinador)

Às pessoas mais importantes na minha vida, sem as quais não teria chegado onde cheguei: Minha esposa (Isabel Cristina), meus filhos (Ana Beatriz, Joao Pedro, Ana Luiza e João Luiz (*in memorian*), *meus Pais, minhas irmãs e todos os meus amigos que colaboraram direto ou indiretamente nesse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o caminho percorrido nesse trabalho

À minha Família pelo apoio dado, encorajando e dando toda força necessária para se chegar à nesse momento

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes pela a oportunidade, orientações e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pela sua competência, confiança e coorientação.

Ao Prof. Dr. Marcos Fernandes Resende Matta por acreditar e ter nos colocado como parceiro em sua pesquisa.

Ao amigo e Prof. Dr. Nilberto Nascimento, que além de incentivador, é um dos responsáveis por essa conquista.

A todos que fazem o Programa Profissional de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (Claudio, Celina), pela atenção e colaboração na resolução das tarefas.

Aos colegas da 3º Turma do programa que apesar dos poucos encontros se fortaleceu em busca do objetivo.

Aos meus amigos do LTSCO (Marcimar, Bárbara, Leonardo, Bruna, Karmille) pela atenção e confiança que depositaram.

As empresas parceiras (HCG, VetAgro) pelo apoio dado nos momentos de prática nos experimentos.

À Me. Bruna Farias Brito pela sua colaboração, dedicação e orientação durante todo o caminho na realização desse projeto.

A todos os meus familiares pela confiança e apoio.

Aos meus amigos pela amizade, respeito, confiança e orientações.

“O senhor é meu pastor e nada me faltará”

(Salmo 23)

RESUMO

A sexagem espermática é uma biotécnica que cada vez mais está sendo utilizada, pois a determinação do sexo da cria traz aumentos na produtividade do agronegócio. No entanto, a citometria de fluxo, técnica mais utilizada, apresenta altos custos, é muito dispendiosa, restrita, e produz um baixo número de espermatozoides sexados por hora. Como uma das alternativas, a imunossexagem, que utiliza anticorpo monoclonal para detecção de antígenos de superfície sexo-específicos, têm apresentado resultados satisfatórios *in vivo* em bovinos e suínos, além de demonstrar ser uma técnica simples e com custos inferiores aos de mercado. Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar o sêmen ovino submetido à técnica de imunossexagem seguida de criopreservação em meio à base de água de coco em pó. O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino em Fortaleza – CE, em parceria com a propriedade Fazenda HCG, localizada no município de Aquiraz – CE. Foram utilizados dois carneiros de raça Santa Inês, puro de origem com idade média de 3 anos. O experimento foi realizado em duas etapas: (1) Criopreservação de espermatozoides ovinos imunossexados e diluídos em meio ACP-102c e avaliação com 1 semana após a criopreservação e (2) Avaliação das mesmas amostras criopreservadas, após 1 ano do crioarmazenamento. As amostras da etapa 1 e 2 foram avaliadas quanto à cinética espermática por análise computadorizada, utilizando o *software Sperm-Class Analyzer*[®] e subjetivamente, e avaliadas quanto as integridades de membranas e alterações morfológicas através da utilização e confecção de esfregaços corados com eosina nigrosina. Os resultados foram submetidos à análise estatística e expressos em média \pm desvio padrão ($p < 0,05$). Quanto a criopreservação, os resultados demonstraram que não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) tanto entre os animais como entre o período de avaliação, exceto no parâmetro de espermatozoides normais entre os animais, no qual o animal um apresentou menor percentual ($P < 0,05$). Já na relação custo-benefício, a técnica de citometria de fluxo apresentou-se como a técnica mais laboriosa e de alto custo, enquanto a imunossexagem associada a criopreservação em diluente ACP102c demonstrou ser a técnica de maior praticidade tanto entre as técnicas de sexagem espermáticas, como também entre os diluentes de conservação, com um custo inferior ao da citometria de fluxo e um maior campo de aplicação, apresentando um melhor custo-benefício. O processo de

imunossexagem associado ao uso do diluente água de coco em pó (ACP102c) pode ser utilizado para criopreservação de sêmen da espécie ovina sem distinção de indivíduo e com período de viabilidade/qualidade espermática semelhante ao sêmen convencional não sexado, como também, mostrou-se como a técnica de melhor custo-benefício para a espécie ovina.

Palavras-chave: Ovinos. Sexagem. ACP. Sêmen.

ABSTRACT

Sperm sexing is a biotechnology that is being used more and more, because determining the sex of the offspring brings increases in agribusiness productivity. However, flow cytometry, the most used technique, has high costs, is very expensive, restricted, and produces a low number of sexed sperm per hour. As one of the alternatives, immunosexing, which uses monoclonal antibody to detect sex-specific surface antigens, has shown satisfactory results in vivo in bovine and swine, in addition to proving to be a simple technique and with lower costs than the market. Therefore, the work aimed to evaluate the ram semen submitted to the immunosexing technique followed by cryopreservation in a powdered coconut water medium. The experiment was carried out at the Goat and Ram Semen Technology Laboratory in Fortaleza - CE, in partnership with the Fazenda HCG property, located in the municipality of Aquiraz - CE. Two purebred Santa Inês rams with an average age of 3 years were used. The experiment was carried out in two stages: (1) Cryopreservation of ram sperm immunosexed and diluted in ACP-102c medium and evaluation 1 week after cryopreservation and (2) Evaluation of the same samples cryopreserved, after 1 year of cryopreservation. The samples from steps 1 and 2 were evaluated for sperm kinetics by computerized analysis, using the Sperm-Class Analyzer® software and subjectively, and evaluated for membrane integrity and morphological changes through the use and making of smears stained with eosin nigrosine. The results were submitted to statistical analysis and expressed as mean \pm standard deviation ($p < 0.05$). As for cryopreservation, the results showed that there were no statistically significant differences ($P > 0.05$) between animals and between the evaluation period, except for the normal sperm parameter between animals, in which animal one had a lower percentage ($P < 0.05$). In the cost-benefit ratio, the flow cytometry technique presented itself as the most laborious and high-cost technique, while immunosexing associated with cryopreservation in ACP102c diluent proved to be the most practical technique both among sperm sexing techniques, as well as among conservation diluents, with a lower cost than flow cytometry and a wider field of application, presenting a better cost-benefit ratio. The immunosex process associated with the use of powdered coconut water diluent (ACP102c) can be used for cryopreservation of ram sperm without distinction of individual and with a period of viability / sperm quality similar to

conventional non-sexed sperm, as well as showed as the most cost-effective technique for ram.

Keywords: Ovine. Sexing. ACP. Semen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Captura de imagens do SCA[®] (<i>Sperm Class Analyzer</i>) com grumos.....	50
Quadro 1 –	Valores preconizados pelo CBRA (2013) para análise do sêmen ovino fresco.....	19
Quadro 2 –	Valores preconizados pelo CBRA (2013) para análise do sêmen ovino descongelado.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre animais quanto aos parâmetros de motilidade, integridade de membrana plasmática, morfologia e funcionalidade de membrana plasmática do sêmen ovino imunossexado e descongelado em ACP-102c.....	51
Tabela 2 – Comparação entre período de descongelação (prazo de validade) quanto aos parâmetros de motilidade total e morfologia do sêmen ovino imunossexado e descongelado em ACP-102c.....	52
Tabela 3 – Custo de produção dos diluentes de conservação e das técnicas de sexagem espermática.....	53
Tabela 4 – Comparativo das técnicas de sexagem/criopreservação de sêmen de pequenos ruminantes.....	54
Tabela 5 – Características dos diluentes de conservação ACP102c e TRIS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ACP	Água de coco em pó
ACP102c	Água de coco em pó para congelação específica para ovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior
CASA	<i>Computer Analyzer System Assisted</i> (Análise de Sistema Computadorizada Assistida)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução
CE	Ceará
CEP	Código de Endereçamento Postal
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr	Doutor
Dr ^a	Doutora
et al.	Colaboradores
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	Gravidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICS	
IMP	Integridade de membrana plasmática
h	Hora
HOST	Hiposmótico
HY ⁺	Espermatozoides positivos para anticorpo HY
kDa	Kilodaltons
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
MP	Motilidade progressiva

MS	Mato Grosso
MT	Motilidade total
n°	Número
N	Número
P	Nível de significância
P.A.	Para Análise
PE	Pernambuco
Prof.	Professor
Prof ^a	Professora
PPGBiotec	Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
Ref	Referência
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
RJ	Rio de Janeiro
s	Segundos
SCA	<i>Sperm Class Analyzer</i>
SP	São Paulo
sptz	Espermatozoides
Tel.	Telefone
UECE	Universidade Estadual do Ceará
USA	United States of America
U\$	Dólar
x	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Ovinocultura.....	17
2.2	Características e avaliações do sêmen ovino.....	18
2.2.1	Motilidade espermática.....	19
2.2.2	Integridade de membrana plasmática e morfologia espermática.....	20
2.3	Aspectos econômicos.....	21
2.4	Sexagem espermática.....	22
2.4.1	Citometria de fluxo.....	22
2.4.2	Imunossexagem.....	24
2.5	Conservação seminal.....	25
2.5.1	Diluyente seminal à base de água de coco.....	25
2.5.2	Refrigeração.....	26
2.5.3	Criopreservação.....	27
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	HIPÓTESE.....	31
5	OBJETIVOS.....	32
5.1	Objetivo geral.....	32
5.2	Objetivos específicos.....	32
6	CAPÍTULO 1.....	33
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXOS.....	63
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS.....	64
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	65

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de sexagem de espermatozoides é relativamente moderna, e está em ascensão no mercado nacional e internacional, uma vez que, a seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite ou carne e em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos. Sendo os machos com maior capacidade de ganho corporal e aqueles destinados ao abate para obtenção de carcaça, o ideal, para a compra dos embriões, seria saber com antecedência qual o sexo do produto (HOHENBOKEN, 1999).

A citometria de fluxo é a técnica de sexagem espermática que se baseia no maior conteúdo de DNA dos espermatozoides X (cerca de 4%), sendo capaz de separar as duas populações de espermatozoides com acuidade acima de 90%. No entanto, ela apresenta altos custos, sendo altamente dispendiosa, e ainda restrita e capaz de produzir um baixo número de espermatozoides sexados por hora (GARNER, 2006; SEIDEL, 2007).

Logo, para a aplicabilidade comercial do sêmen sexado, sugere-se o estabelecimento de um método que minimize a perda dos espermatozoides durante o processo e que não reduzam o seu poder fecundante. Além disso, considera-se que, para a realidade de países como o Brasil, será mais interessante optar-se pelo desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo, que, mesmo com menor acuidade de sexagem, permita alcançar índices satisfatórios de fertilidade em várias condições de manejo (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 2011).

Assim, estudos voltados para o aprimoramento de métodos alternativos à citometria de fluxo para sexagem espermática tem se intensificado. Como uma das alternativas, a imunossexagem, que utiliza anticorpo monoclonal para detecção de antígenos de superfície sexo-específicos, têm apresentado resultados satisfatórios *in vivo* em bovinos e suínos, além de demonstrar ser uma técnica simples e com custos inferiores aos de mercado, despertando interesse na cadeia produtiva da pecuária (MATTA, 2016).

A inexistência de trabalhos de imunossexagem em ovinos, especialmente da raça Santa Inês no Nordeste do Brasil, poderá incrementar esta biotécnica reprodutiva para um melhor aproveitamento do uso desses reprodutores para a produção de carne, guardando ainda uma relação custo/benefício favorável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVINOCULTURA

A ovinocultura, criação de ovinos para a produção de carne e lã, está presente em todas as partes do mundo, bem como se encontra difundida por todo território nacional, em virtude de sua adaptabilidade às condições adversas e de sua habilidade para transformar material fibroso e de baixo valor nutritivo em alimentos de alto valor proteico (FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL, 2010).

Existe uma notável concentração dos ovinos localizados principalmente na Ásia, Oceania e Europa. China, União Europeia e Austrália onde se localizam mais de 30% do rebanho ovino mundial e quase metade da produção de carne (FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL, 2010).

De acordo com o levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), entre os anos de 1996 a 2018, o Brasil passou de 14,7 milhões de cabeça para um efetivo superior a 18,0 milhões (IBGE, 1996; IBGE, 2018). Na região Nordeste a criação desses animais destina-se basicamente à produção de carne, enquanto na Região Sul tem-se também a produção e a comercialização de lã (IBGE, 2015). No estado do Ceará, o rebanho de ovinos corresponde aproximadamente a 2,0 milhões de cabeça, sendo o terceiro maior rebanho da região Nordeste, ficando aquém dos estados da Bahia e Pernambuco, e com o quarto rebanho nacional (IBGE, 2018).

A demanda por carne ovina de qualidade tem aumentado nos últimos anos, levando à expansão desse agronegócio em diversas regiões do Brasil, transformando o cenário dos sistemas produtivos, tornando-se um atrativo de forma significativa para a fixação das populações no meio rural, mas a produção do Brasil não tem sido suficiente para abastecer o mercado interno (ALVES; HOLANDA JÚNIOR; LOPES, 2008).

Entre os entraves para melhor inserção no mercado está a carência de acesso às tecnologias para a produção de ovinos. Com o incremento no consumo de carne ovina, novos padrões de carcaça são exigidos pelo mercado, o que demandam aumento na eficiência produtiva, através de um maior número de animais nascidos bem como a precocidade no ponto de abate. Em função dessa demanda, faz-se necessário a incorporação de biotecnologias reprodutivas nos sistemas de produção

e definição de estratégias de manejo que permitam aumentar a produção de animais precoces com maior rendimento e qualidades de carcaça, para viabilização da competitividade sistêmica e o conseqüente incremento da cadeia produtiva da carne ovina (NOGUEIRA FILHO, 2006 apud ARO; POLIZER; PENA, 2008).

Os sistemas de produção de ovinos, atualmente, estão embasados em um tripé que consiste em biotécnicas sobre sanidade, nutrição e reprodução, utilizando reprodutores geneticamente superiores. Se os mesmos não estiverem interligados e funcionando de maneira harmônica o sistema de produção estará em declínio (SIMPLÍCIO, 2001).

Desta forma, considerando os diferentes tipos de criações (carne, leite e lã), quanto ao manejo reprodutivo, a utilização de biotecnologias reprodutivas de inseminação artificial com sêmen sexado são de grande valia, uma vez que, seria possível em um sistema de produção direcionado ao abate, no caso da Região Nordeste, programar o nascimento de um maior percentual de machos, resultando em uma oferta constante do produto no mercado (SEIDEL, 2007). Além disso, outro fator relevante para o controle dos sexos dos animais de produção de carne é a seleção de fêmeas para reposição de matrizes, permitindo o aceleração do melhoramento genético em maiores escalas (HOHENBOKEN, 1999).

2.2 CARACTERÍSTICAS E AVALIAÇÕES DO SÊMEN OVINO

O sêmen ovino é composto por células espermáticas produzidos nos testículos, juntamente com o plasma seminal produzido pelas glândulas anexas. O sêmen ovino apresenta características peculiares inerente à sua espécie, seu ejaculado apresenta volume, aspectos (cor, odor e vigor), concentração espermática, pH, movimentos progressivos, bem como defeitos/anomalias, podendo essas ter várias causas para o seu aparecimento (Quadro 1 e 2) (CBRA, 2013).

As avaliações espermáticas são realizadas conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), presentes no Quadro 1 e 2. Os ejaculados são avaliados quanto ao volume (ml), cor (branca ou amarelo-marfim para espécie ovina), odor (*sui generis*), aspecto (cremoso, leitoso ou aquoso), turbilhonamento (0-5), vigor (0-5), motilidade total (0-100%), viabilidade, morfologia e a concentração espermática, sendo esta, mensurada em câmara de Neubauer (espermatozoides/mm³) (CBRA, 2013).

Quadro 1 - Valores preconizados pelo CBRA (2013) para análise do sêmen ovino fresco

Parâmetros	Valores
Volume (ml)	0,5 – 3,0
Cor	Branca ou amarelo-marfim
Turbilhonamento (0-5)	≥ 3
Concentração (10 ⁹ sptz/ml)	1 – 3
Motilidade (%)	≥ 80
Vigor (0-5)	≥ 3
Anormalidades (%)	< 20

Fonte: BRITO (2017) adaptado de CBRA (2013).

Quadro 2 - Valores preconizados pelo CBRA (2013) para análise do sêmen ovino descongelado

Parâmetros	Valores
Concentração (10 ⁶ sptz/ml)	400
Motilidade (%)	≥ 30
Vigor (0-5)	≥ 3

Fonte: BRITO (2017) adaptado de CBRA (2013).

2.2.1 Motilidade espermática

A motilidade espermática é fundamental para que os espermatozoides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização, sendo uma das mais importantes características para a avaliação do potencial de fertilidade da célula espermática. Entretanto, os resultados das avaliações microscópicas dependem de diversos fatores, tais como: meio utilizado na diluição seminal, taxas de diluição, temperatura e tempo de realização durante a avaliação. Na avaliação convencional, a motilidade espermática é estimada visualmente em microscopia óptica e com análise de uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula (CAVALCANTE *et al.*, 2005).

Os sistemas de análises computadorizadas têm substituído a avaliação de sêmen por microscopia de luz convencional, uma vez que proporcionam informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria, além de imprimir maior repetibilidade às observações do que a habilidade do técnico em identificar padrões de motilidade espermática (CAVALCANTE *et al.*, 2005).

2.2.2 Integridade de membrana plasmática e morfologia espermática

A viabilidade espermática está relacionada com a integridade da membrana plasmática. Esta pode ser avaliada através de colorações vitais, onde os espermatozoides que possuem integridade de membrana, não são corados (viáveis) e os que não possuem, permitem a entrada do corante no citoplasma (não viáveis). Dentre os corantes utilizados podem ser citados, além da eosina nigrosina, o azul de tripan, o Giemsa e o azul de bromofenol (CHEMINEAU *et al.*, 1991; DERIVAUX, 1980).

Como apenas os espermatozoides viáveis são capazes de interagir com o ovócito e iniciar o processo de fertilização, sabe-se que além da integridade de membrana, os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e a infertilidade masculina. Assim, a análise da morfologia espermática permite a identificação de animais com baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada desses animais nos programas de congelamento de sêmen e nos testes de progênie (FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2009).

A classificação das anormalidades espermáticas dos ejaculados proposta por Blom (1950) apud Arruda (2015) foi dividida em três grupos. No primeiro grupo, denominado de "Anomalias espermáticas primárias", são aquelas anomalias que apresentam suas origens devido à desordem do epitélio seminífero (formas anormais de cabeça, anomalias de desenvolvimento de acrossomo e certas anomalias de peça intermediária e da cauda). No segundo grupo, denominado de "Anomalias espermáticas secundárias", são aquelas formas que aparecem no espermatozoide como resultado de condições não fisiológicas, possivelmente ocorrentes desde o epidídimo até o momento da ejaculação. As anomalias espermáticas secundárias compreendem as cabeças normais destacadas, espermatozoides com gotas citoplasmáticas persistentes e caudas dobradas. Finalmente, no terceiro grupo, o autor reuniu a ocorrência de outras células primitivas comumente verificadas em

animais com degeneração testicular, hemácias, piócitos, células epiteliais e medusas (ARRUDA et al, 2015).

Para análise da viabilidade e da morfologia espermática são confeccionados esfregaços em lâmina pré-aquecida a 37 °C utilizando 5 µl do corante eosina nigrosina (eosina 1 g, nigrosina 2 g, citrato de sódio 3,57 g e água destilada q.s.p. 100 ml - BARIL *et al.*, 1993), adicionado a 5 µl do sêmen rediluído.

2.3 ASPECTOS ECONÔMICOS

A venda de sêmen sexado vem crescendo no cenário da atual pecuária nacional, em 2011 já eram vendidas cerca de quase 12 milhões de doses de sêmen, e acredita-se que entre 600 a 800 mil doses são de espermatozoides sexados embora não há estatística para esse dado (MILKPOINT, 2011 apud SCOTT *et al.*, 2018).

A sexagem de espermatozoides visa à máxima produção com menor custo e a possibilidade de produzir doses inseminantes com espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y especificamente de acordo com a necessidade de cada programa de melhoramento genético (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). Na bovinocultura o uso do sêmen sexado tem, entre seus vários benefícios, a produção de maior número de machos para produção de touros reprodutores e estocagem de determinada unidade comercial e a produção de fêmeas para reposição ou aumento do rebanho (matrizes) (HOHENBOKEN, 1999).

Neste cenário de mercado, afim de ampliar o uso do sêmen sexado, têm-se intensificado buscar por técnicas mais viáveis economicamente e dentre as técnicas alternativas à citometria de fluxo, a imunossexagem é uma que vem ganhando bastante destaque.

Com base nas análises do custo de produção, a dose de sêmen bovino imunossexada produzida pela HY Biotecnologia estaria a disposição à um valor de seis dólares enquanto a que se encontra no mercado custa 18 dólares (MATTA, 2018 apud BRITO *et al.*, 2018). Desta forma, Matta (2018) apud Brito *et al.* (2018) supôs ao inseminar 100 vacas, obtendo-se 70 embriões, e destes 52 embriões fêmeas com sêmen imunossexado o custo das inseminações artificiais sairia por 600 dólares, enquanto que o mesmo número de vacas inseminadas com o sêmen comercial sexado, obtendo 40 embriões, o custo seria de 1.800 dólares com apenas 36 embriões

fêmeas. Logo, cada embrião fêmea produzido com sêmen imunossexado custaria 11.53 dólares enquanto o comercial sexado custaria 50 dólares.

Além disso, vale ressaltar que o custo de uma vaca vazia por mês é de aproximadamente 500 dólares e de acordo com estudos realizados por Matta (2018), considerando um rebanho de 100 vacas, a diferença de custo com fêmeas vazias seria de U\$ 15.000,00 por mês a mais em rebanhos que utilizam o sêmen sexado comercializado, atualmente, quando comparado ao que seria utilizado o sêmen imunossexado.

Em ovinos e caprinos, ainda não se tem conhecimento de dados na literatura quanto ao custo de produção e valor comercial da dose de sêmen sexado. Em relação ao sêmen convencional/não sexado, em caprinos a dose pode custar entre 3 - 25 dólares. Desta forma, estimando a produção de 25 doses de sêmen sexado por ejaculado de ovino com a mesma dose inseminante do convencional, estas doses teriam um custo de 80 dólares cada, 55 dólares a mais que a dose convencional. No entanto, considerando que a dose inseminante do sêmen sexado é inferior à do convencional, na qual é observado um intervalo de 30-100 x 10⁶ spz/ml para a espécie ovina, logo, seria possível obter-se aproximadamente 100 doses do sêmen imunossexado à um custo de aproximadamente 20 dólares, valor aproximado ao encontrado no mercado para sêmen convencional (MACHADO *et al.*, 1996; MATTA, 2018, HY Biotecnologia, Informação pessoal).

2.4 SEXAGEM ESPERMÁTICA

2.4.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, atualmente, é a técnica de sexagem mais utilizada e que permite um alto grau de pureza. Esta consiste na emissão de raios *laser*, na adição de corantes fluorescentes, produzindo uma coloração diferencial dos espermatozoides que permitem a identificação das células com base na diferença física em relação ao DNA, na intensidade de fluorescência emitida e nas forças hidrodinâmicas direcionando-os durante a separação (GARNER *et al.*, 1983; GARNER, 2006; SEIDEL JR., 2007).

Os primeiros trabalhos medindo diferenças na quantidade de DNA utilizando um fluorocitômetro de fluxo foram realizados na década de 80. Um aparelho

capaz de medir diferenças de volume entre células, chamado de citômetro de fluxo, foi modificado para medir diferenças celulares de fluorescência (FULWALER, 1965; PINKEL *et al.*, 1982 apud ALMEIDA; ALVAREZ, 2003). Posteriormente, foram realizados estudos que aprimoraram a técnica, onde foi desenvolvido um novo sistema orientado por funil permitindo a separação dos espermatozoides de maneira mais rápida e eficaz (JOHNSON; WELCH, 1999).

Os primeiros bovinos “sexados” usando a citometria na separação do sêmen, foram obtidos por CRAN *et al.* (1993), usando espermatozoides Y na FIV e posterior transferência dos embriões em receptoras, tendo obtido 90% de bezerros machos e em 1996 o primeiro cordeiro (CATT *et al.*, 1996).

No entanto, a triagem sexual por citometria de fluxo ainda é um processo lento e pode causar alterações estruturais aos espermatozoides, ocasionando redução em sua viabilidade (CARVALHO *et al.*, 2018). Mas, apesar dessas desvantagens, os espermatozoides viáveis sexados por este método podem ser congelados/descongelados com fertilidade aceitável. Assim, pela sua alta exatidão, essa técnica é usada como método de validação para outras técnicas de separação.

Outras desvantagens associadas à citometria são a baixa eficiência e a necessidade de equipamento relativamente caro e profissionais qualificados. A baixa eficiência se deve ao fato de que mesmo com todas as melhorias realizadas para acelerar o sistema, só podem ser separados aproximadamente 6×10^6 espermatozoides de cada sexo por hora (JOHNSON, 2000). Logo, para se obter uma quantidade suficiente de espermatozoides sexados para uma só dose de IA convencional se levaria mais de duas horas. Desta forma, são utilizadas doses com apenas aproximadamente 2 milhões de espermatozoides, e o local de depósito sendo intracornual profundo, ou em procedimentos de FIV e ICS (JOHNSON; CRAN; POLGE, 1994; JOHNSON, 2000; SCOTT *et al.*, 2018).

Assim, esses inconvenientes fazem com que a citometria de fluxo tenha um custo de mercado considerado elevado, restringindo o seu uso à fecundação *in vitro* de oócitos, os quais requerem um reduzido número de espermatozoides (caso de ICSI e FIV). E além disso, os possíveis efeitos deletérios inerentes à técnica (mecânicos, coloração vital do DNA, exposição ao laser) na viabilidade dos espermatozoides 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, por exemplo (ALMEIDA; ALVAREZ, 2003).

2.4.2 Imunossexagem

Em 1955, o antígeno H-Y foi descrito pela primeira vez por Eichwald e Silmsler como sendo um antígeno relacionado ao sexo masculino. Os primeiros estudos foram realizados em camundongos, utilizando o anti-HY associado ao complemento, no qual observaram a lise de 50% dos espermatozoides HY positivos (HY+) (GOLDEBERG *et al.*, 1971).

Hendriksen (1999) pesquisando sobre a expressão gênica de cromossomos X e Y durante a espermatogênese e possíveis diferenças entre espermatozoides portadores de cromossomos X e Y, sugeriu que a identificação de uma proteína de membrana plasmática específica para espermatozoides X ou Y proporcionaria grandes oportunidades de separação. Isso seria possível, uma vez que, os peptídeos H-Y são apresentados como um grande complexo de histocompatibilidade de moléculas sobre a superfície da célula, viabilizando a sexagem dos espermatozoides em larga escala através da imunologia pelas proteínas de superfície dos anticorpos específicos, anti espermatozoide “X” e anti espermatozoide “Y” (HENDRIKSEN, 1999).

Pascarelli Souza *et al.* (1999), estudando proteínas machos-específicas de 19 KDa, a partir da membrana plasmática de bovinos, produziram anticorpos monoclonais a partir desta proteína e verificaram a eficiência desses anticorpos sobre o sêmen fresco de bovinos, obtendo-se 48,2% de espermatozoides marcados com a presença do clone C11F do anticorpo monoclonal.

Em ovinos, Tilburg *et al.* (2006) sugeriu que nem todas as proteínas de 25 Kda são sexo específicas, que apenas a proteína com tempo de retenção de 39’1” está presente somente no tecido do macho.

Com base nessa linha de pesquisa, Matta (2000) desenvolveu um sistema utilizando anticorpos monoclonais contra a proteína sexo-específica associada a via clássica do complemento, onde se utilizam somente anticorpos para espermatozoides do sexo indesejado, o qual gerou uma patente (N/Ref.:PI 0005045-8A2).

A metodologia da imunossexagem desenvolvida por Matta (2000) consiste na incubação dos ejaculados com o anticorpo monoclonal e o complemento, e após o

período de incubação as células espermáticas não desejadas estarão destruídas, podendo-se seguir com o protocolo de conservação das células espermáticas. A lise desses espermatozoides ocorre devido a formação de poros na membrana de espermatozoides, que, por diferença de pressão osmótica, faz com que o líquido do meio penetre, matando assim o espermatozoide (MATTA, 2016).

Os primeiros resultados dessa técnica foram em bovinos, onde vacas de rebanhos leiteiros foram inseminadas com sêmen imunossexado obtendo um percentual de 77% de fêmeas nascidas de um total de 1023 crias. Em outro rebanho, avaliando a sexagem dos embriões por ultrassonografia, obteve-se 71,05% de prenhez positiva de um total de 38 vacas inseminadas, sendo 77,77% de fêmeas e 22,23% de machos. Um trabalho comparando o sêmen convencional, o imunossexado-HY e o sexado comercial, obteve-se 50%, 79,73% e 41,89% de prenhez positiva, respectivamente (MATTA, 2018; HY Biotecnologia, Informação pessoal).

Atualmente, tem sido realizados estudos nessa linha de pesquisa, avaliando a eficácia e otimização dessa técnica em diversas espécies como em bovinos, suínos, equinos, ovinos, caprinos e cães. E a imunossexagem tem se apresentado como uma técnica bastante promissora, que por ser um método que utiliza anticorpos monoclonais, permite o processamento de várias amostras a baixo custo, minimiza a perda de espermatozoides durante o processo e maximiza o desvio da proporção do sexo, garantindo a repetibilidade e alta confiabilidade (MATTA, 2016).

2.5 CONSERVAÇÃO SEMINAL

2.5.1 Diluente seminal a base de água de coco

O uso de diluentes seminais proporcionam um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro*, além de facilitar a divisão do ejaculado em doses inseminantes (DERIVAUX, 1980). A composição do diluente é um dos fatores que afetam a proporção de espermatozoides vivos após a descongelação (WATSON, 2000), sendo seu incremento um dos desafios da biotecnologia da reprodução de ovinos.

Após o processo de conservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade a fim de alcançar o local da fecundação e manterem a

integridade das membranas espermáticas para levarem a cabo a penetração do ovócito já que qualquer falha inerente à fisiologia espermática poderia prejudicar sua capacidade de fertilização do oócito bem como de suportar o desenvolvimento embrionário (HOLT; LOOK, 2004 apud CAVALCANTE, 2012; ROYERE, 1996).

Neste cenário, a água de coco tem se destacado, apresentando resultados satisfatórios na preservação espermática de diversas espécies como caprinos (CÂMARA, 2017; MELO, 2010), ovinos (BRITO, 2017; CAVALCANTE, 2014; SOUSA, 2016), suínos (TONIOLLI *et al.*, 2013), canídeos (CARDOSO, 2006; UCHOA *et al.*, 2010), peixes (MELO-MACIEL *et al.*, 2015) e silvestres (SILVA *et al.*, 2011). Os primeiros estudos com a água de coco iniciaram por Nunes (1998), utilizando-a na forma ainda *in natura* na conservação de espermatozoides caprinos que classificou a água de coco como um bom diluente, pois fornece os nutrientes como sais, proteínas, carboidratos, vitaminas, fosfolipídios e eletrólitos necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos.

Adicionalmente, o diluente de conservação espermática à base de água de coco apresenta como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quanto à conservação por longos períodos após sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos (CAVALCANTE, 2012).

Com base nessas dificuldades, Salgueiro *et al.* (2002) desenvolveram o produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura*. Para conservação do sêmen ovino, foi desenvolvida a formulação ACP102, sendo o produto ACP102c destinado à criopreservação do sêmen desta espécie.

2.5.2 Refrigeração

O frio é o agente mais eficaz na promoção da diminuição das atividades metabólicas dos espermatozoides, permitindo que a célula permaneça viável por várias horas mantendo taxas de fertilidade aceitáveis (MIES FILHO, 1987).

O sêmen para ser conservado em refrigeração precisa passar por três etapas entre a coleta e a conservação: diluição, diminuição da temperatura e armazenamento do sêmen (BARIL *et al.*, 1993). A redução da temperatura consiste no decréscimo da temperatura seminal de 37°C para temperaturas próximas de 0°C, utilizando equipamentos convencionais como refrigerador, garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo, ou ainda, equipamentos automatizados (CÂMARA; GUERRA, 2011).

Em relação a redução de temperatura, vale ressaltar que esta deve ser realizada de forma constante e homogênea, não podendo ser brusca, já que pode ocasionar choque térmico e redução da viabilidade espermática. De acordo com Baileyet, Bilodeaub e Cormier (2000), espermatozoides mamíferos não sobrevivem quando submetidos a curvas de refrigeração muita intensas, havendo a perda da seletividade da membrana plasmática aos íons cálcio, queda de motilidade e morte celular, fenômenos relacionados ao choque frio (GOMES, CRESPILO; GOMES, 2015). Entretanto, de forma lenta pode ocasionar tensão na membrana espermática (WATSON, 2000).

Entre as principais vantagens da refrigeração seminal, está a manutenção da viabilidade espermática por um período prolongado, com a minimização da redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides. Outra característica importante é a possibilidade de diminuir o estresse imposto aos reprodutores pelo número excessivo de cópulas diárias durante a estação reprodutiva, podendo prejudicar os índices reprodutivos do rebanho (BISPO, 2005). Entretanto, apesar dessas diversas vantagens, a conservação seminal pelo método de refrigeração possui o prazo de viabilidade limitado à períodos de manutenção de aproximadamente 36 horas, dificultando o seu transporte para regiões mais distantes.

2.5.3 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica que vem sendo cada vez mais empregada nas biotécnicas reprodutivas. Ela permite o armazenamento de material genético por tempo indeterminado e o melhor aproveitamento de animais de alto valor zootécnico,

preservando seu material genético por vários anos, além de reduzir custos com a manutenção de animais na propriedade, podendo ter grande variação genética com apenas um botijão criogênico. (PURDY, 2006).

Quando comparada à refrigeração, a criopreservação possui uma certa desvantagem, uma vez que a viabilidade do sêmen congelado/descongelado, em geral, é menor do que o sêmen refrigerado devido as mudanças de temperatura, à formação de cristais de gelo, aos estresses oxidativos e ao gradiente osmóticos, que ocasionam uma série de alterações estruturais resultando em danos a membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas. Entretanto, essas crioinjúrias podem ser minimizadas quando se adiciona crioprotetores penetrantes e não penetrantes ao diluente (WATSON, 2000).

Na espécie ovina o crioprotetor penetrante mais utilizado é o glicerol e o não penetrante é a gema de ovo. O glicerol tem como função penetrar na célula espermática através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, tornando o meio hipertônico, promovendo a desidratação da célula, e conseqüentemente prevenindo a formação de cristais de gelo dentro da célula (PURDY, 2006).

A gema de ovo que tem como função estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativo do choque térmico (HOLT, 2000). Foulkes (1977) propôs que ação seja devido aos componentes da gema que se ligam firmemente às membranas espermáticas, exercendo papel protetor ao estabilizarem a membrana durante a refrigeração, ou ao conseguirem manter a pressão coloidal do meio externo.

Já Farstad (1996) propôs que a presença de lipoproteínas de baixa densidade, que atuam na membrana plasmática do espermatozoide, restaurando a perda de fosfolipídios e aparentemente induzindo uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente, prevenindo a ruptura da membrana plasmática.

3 JUSTIFICATIVA

A ovinocultura moderna ou também denominada de ovinocultura de resultados está dividida em três bases (sanidade, nutrição e reprodução) de suma importância para o aumento da produtividade na produção rural. A bases reprodução animal assistida do rebanho dispõe de biotécnicas reprodutivas que irão favorecer para o aumento da produção de ovinos.

A sexagem espermática é uma dessas biotécnicas que estão disponíveis para os criadores. Esta possui relevância importante na produção de ovinos, onde o criador tem a possibilidade de melhorar a seleção genética do seu rebanho, bem como definir os animais para a produção de carne e/ou para a produção de leite. No entanto, sua aplicabilidade de maneira mais comercial deixa a desejar, pois ainda se trata de uma técnica onerosa, e que poucos criadores tem acesso.

Atualmente, no mercado existem diversas técnicas de sexagem espermática, uma das mais conhecidas é a sexagem por citometria de fluxo, porém essa técnica apresenta algumas desvantagens. Na citometria de fluxo as doses de sêmen se apresentam com baixas concentrações, são muito caras e só podem ser usadas em fêmeas jovens. Quando comparada a citometria, a imunossexagem possui algumas vantagens, uma vez que as doses de sêmen se apresentam em altas concentrações, são de custo inferior e podem ser usadas por fêmeas primíparas e múltíparas, jovens e adultas. Desta forma a técnica da imunossexagem poderá abranger um público mais amplo, onde médios e pequenos criadores poderão usufruir para um maior melhoramento genético dos seus pequenos rebanhos e conseqüentemente melhorando a sua produtividade.

Em relação aos diluentes seminais, estudos vem sendo realizado com o uso da água de coco *in natura* desde a década de 80, e mais recentemente com água de coco em pó desde de 2002, apresentando resultados satisfatórios quanto a preservação espermática. Estudos indicam que a água de coco contem nutrientes como fonte de energia, protege os espermatozoides contra o efeito do frio, proporciona um meio tampão, mantendo a pressão osmótica adequada e protege as células espermáticas durante a criopreservação.

Quanto a análise econômica, no que se diz respeito ao custo unitário da dose, estima-se que o sêmen imunossexado ovino tenha o preço mais elevado que a dose de sêmen convencional. Entretanto, a imunossexagem em bovinos apresenta

um custo-benefício melhor quando comparado com outras técnicas de sexagem espermática. Além disso, a partir de um ejaculado de um reprodutor ovino pode-se produzir até 25 - 100 doses de sêmen imunossexado, as quais podem ser produzidas na própria fazenda onde os animais se encontram e com concentrações espermáticas superiores às doses sexadas obtidas pela técnica de citometria de fluxo.

Assim, com a relevância de todas essas características da imunossexagem, juntamente com as do ACP102c, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de desenvolver/aprimorar a técnica de imunossexagem associada a criopreservação de sêmen ovino em meio ACP102c. Além disso, a qualidade dessas células espermática pós descongelação, decorridos um ano, poderão se mostrar viáveis para serem utilizadas quer seja em uma inseminação artificial ou em uma transferência de embrião e com o melhor custo-benefício para ser acessível à todos os tipos de produtores. Como também, pela necessidade de realização de estudos avaliando a relação custo-benefício do protocolo de sexagem espermática na espécie ovina.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O Kit de anticorpo monoclonal contra proteína sexo-específica associada à via clássica do complemento é eficaz na sexagem das células espermáticas de ovinos.

O meio de criopreservação seminal água de coco em pó (ACP102c) adicionado dos crioprotetores (gema de ovo e glicerol) mantém a qualidade espermática do sêmen ovino sexado após a criopreservação.

A técnica de imunossexagem apresenta melhor relação custo-benefício quanto a análise de mercado.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o sêmen ovino submetido à técnica de imunosssexagem seguida de criopreservação em meio à base de água de coco em pó e seus aspectos econômicos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imunossexar espermatozoides da espécie ovina através da técnica de anticorpo monoclonal pela via clássica do complemento;
- Criopreservar de espermatozoides da espécie ovina imunosssexados em meio à base de água de coco em pó;
- Avaliar a qualidade de espermatozoides da espécie ovina criopreservados em meio à base de água de coco em pó por animal;
- Avaliar a qualidade de espermatozoides da espécie ovina criopreservados em meio à base de água de coco em pó após o protocolo e um ano após a congelação;
- Avaliar a relação custo-benefício do protocolo de sexagem espermática na espécie ovina.

6 CAPÍTULO I

Aspectos econômicos e avaliação do período de viabilidade de espermatozoides ovino imunossexado e diluídos em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP102c)

Economic aspects and evaluation of the viability period of immunosexed and diluted ram sperm in powdered coconut water conservation extender (ACP102c)

Periódico: Acta Scientiae Veterinariae
(Submetido em 16 de março de 2020)
Qualis B1

**Aspectos Econômicos e Avaliação do Período de Viabilidade de Espermatozoides Ovino
Imunossexado e Diluídos em Meio de Conservação à Base de Água de Coco em Pó
(ACP-102c)**

Economic Aspects and Evaluation of the Viability Period of Immunosexed and Diluted Ram
Sperm in Powdered Coconut Water Conservation Extender (ACP-102c)

Luiz Carlos Pinheiro Maia¹, Bruna Farias Brito², Bárbara Mara Bandeira Santos³, Leonardo
Alves Rodrigues Cabral², Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{1,3}, Marcos Fernando de
Resende Matta⁴ & José Ferreira Nunes^{1,2,3}

¹Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (PPGBiotec), ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), ³Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil. ⁴Centro de Biociência e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.
CORRESPONDENCE: J.F. NUNES [ferreira.nunes@uece.br – Tel.: +55 (85) 31019851].
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Avenida Dr. Silas Munguba, 1700, Itaperi, CEP 60714-903, Fortaleza, CE, Brasil.

ABSTRACT

Background: Sperm sexing is increasing in use because pre-determining the sex of the calf allows greater profitability and promotes significant gains in the productive systems that utilize the technique. Deployment of a low-cost and practical preservation methodology may further favor the cost-benefit ratio. Flow cytometry, the most commonly used sexing technique, has high costs and is very restricted. As an alternative, immunosexing has been studied, which uses sex-specific monoclonal antibodies. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunosexing technique in conjunction with cryopreservation in ACP-102c and examine its economic aspects with regard to ram semen.

Materials, Methods & Results: Ejaculates from two ram individuals were collected with the aid of an artificial vagina, evaluated, and submitted to the immunosexing protocol, according to the manufacturer's recommendations, using the Monoclonal Antibody Kit specific for mammalian sperm with "Y" chromosomes (HY; HY Biotechnology, Rio de Janeiro-RJ, Brazil). After sexing, the supernatant was resuspended in the cryopreservation diluent: ACP (ACP-102c + 20% egg yolk + 7% glycerol), packaged in 0.25 mL straws, refrigerated to 4 °C, stabilized for 30 min, frozen in liquid nitrogen vapors (-60 °C) for 15 min, immersed in liquid nitrogen, and stored in cryogenic cylinders. The samples were thawed and evaluated for sperm kinetics both by using computerized semen analysis with SCA® software (*Sperm Class Analyzer version 5.0*) and subjectively comparing specimens from the two animals using conventional microscopy (40x). Plasma membrane integrity (IMP) and sperm cell morphology were evaluated by the smear staining technique using eosin-nigrosine dye, and the percentages of healthy and normal spermatozoa were determined. A bibliographic survey and a market study of similar products and technologies were carried out to provide an economic viability metanalysis of the bioproduct (ACP-102c) and bioprocess (immunosex). The data were

analyzed using R-project[®], and comparisons made between animals and between thawing periods using *T test*. There were no statistically significant differences between animals and between periods ($P > 0.05$), except for the normal sperm parameter, in which animal A1 had the lowest percentage ($P < 0.05$). As for the cost-benefit ratio, flow cytometry as a technique is more laborious and expensive, while immunosexing associated with cryopreservation in ACP-102c diluent has proven more practical, with regards to both sperm sexing techniques and diluents for sperm conservation.

Discussion: In general, the quality of cryopreserved sexed semen was lower than that of non-sexed semen; however, in this study, both in the comparison between animals and between evaluation periods, similar values of motility, viability, and sperm morphology were obtained for sexed and several non-sexed cryopreserved semen samples, demonstrating that immunosexing did not severely affect the sperm structure, and that the ACP-102c conservation medium was efficient at maintaining the plasma membrane of these sperm. In the evaluation of economic aspects, it was observed that immunosexing, associated with cryopreservation in ACP-102c diluent, proved to be the most practical technique, requiring only conventional equipment, and allowing a greater field of application, since the immunosexing semen can be used for primiparous and multiparous females. Thus, it was concluded that immunosexing associated with cryopreservation in an ACP-102c diluent was more cost-effective, more practical, and had significantly improved sperm quality results after sexing.

Keywords: ovine, sperm, freezing, antibody, sexing.

INTRODUÇÃO

A sexagem espermática é uma biotécnica que está sendo utilizada cada vez mais, pois a determinação do sexo da cria traz maior rentabilidade ao agronegócio. Apresenta ganhos significativos nos sistemas produtivos que a utilizam e o seu uso, associado a um diluente de baixo custo e de uso prático, poderá favorecer ainda mais a relação custo-benefício.

A citometria de fluxo, técnica mais utilizada, apesar de ter uma ótima acuidade, apresenta altos custos, é muito dispendiosa, restrita e produz um baixo número de espermatozoides sexados por hora. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de uma técnica que diminua as perdas espermáticas durante a sexagem, minimizando a redução de seu poder fecundante [1].

Desta forma, é mais interessante optar-se pelo desenvolvimento de uma técnica de baixo custo que alcance índices satisfatórios de fertilidade em diferentes condições de manejo, tornando economicamente viável para pequenos e médios produtores rurais. Técnicas alternativas têm sido estudadas, entre elas, a imunossexagem utilizando anticorpo monoclonal para detectar antígenos de superfície sexo-específicos, já sendo bastante promissora na bovinocultura e na suinocultura [2].

Em ovinos, também tem se destacado o ACP-102c, diluente à base de água de coco em pó. Estudos indicam que este contém substâncias que protegem os espermatozoides contra o efeito do frio, mantém a pressão osmótica adequada, protegendo as células espermáticas durante a criopreservação [3].

Na espécie ovina, ainda não existe relato de trabalhos científicos na área. Diante disso, objetivou-se avaliar a técnica de imunossexagem seguida de criopreservação em ACP-102c e seus aspectos econômicos quanto ao sêmen de ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e controle da qualidade do sêmen

Amostras de sêmen de dois carneiros da raça Santa Inês foram coletadas com o auxílio de uma vagina artificial adequada à espécie, na presença de uma ovelha. Após as coletas, as amostras de sêmen foram mantidas em banho Maria a 37 °C e avaliadas quanto ao volume (mL) e motilidade massal (0 a 5) [4]. Somente ejaculados com volume superior a 0,5 mL e motilidade massal ≥ 3 foram utilizados para o experimento. Em seguida, os ejaculados foram avaliados quanto a concentração espermática ($1 - 3 \times 10^9$ spz/mL) determinada em câmara de Neubauer [4].

Imunossexagem e criopreservação seminal

Os ejaculados foram submetidos ao protocolo de imunossexagem, os quais foram inicialmente diluídos em D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)¹ na proporção de 1:14, centrifugados a 600g por 10 min. e retirado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em 2,5 ml de anticorpo (Anti-HY)², adicionado de 12,4 mL de D-PBS e 100 µL do complemento e mantido em banho Maria (Bivolt BM02)³ a 35 °C por 1 h. Após o período de incubação, a amostra foi novamente centrifugada a 600g por 10 min, retirado o sobrenadante e adicionado o diluente de criopreservação: ACP (ACP-102c + 20% gema de ovo + 7% glicerol), obtendo uma concentração final de 400×10^6 spz/mL.

O meio de criopreservação à base de água de coco em pó (ACP-102c)⁴, específico para espécie ovina, foi preparado de acordo com o fabricante, sendo diluído em 50 mL de água destilada e acrescido de 40 mg de gentamicina (Gentamax[®])⁵.

Após a diluição, todas as amostras foram envasadas em palhetas de inseminação artificial de 0,25 mL (palhetas francesas IMV)⁶ e refrigeradas até 4 °C em 120 min, a um decréscimo de 0,35 °C/min. Ao atingir 4 °C, as amostras foram mantidas nessa temperatura por 30 min para

estabilização. Após este período, as palhetas foram congeladas em vapores de nitrogênio líquido (-60 °C) por 15 min, a uma altura de 4 cm do nitrogênio líquido, e então imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijões criogênicos.

Avaliação “in vitro” do sêmen criopreservado

Para avaliação do sêmen criopreservado, quatro palhetas por animal foram descongeladas em banho Maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em tubos plásticos (Eppendorfs)⁷ e incubadas por 5 min em banho Maria a 37 °C, sendo duas após sete dias da criopreservação e duas após um ano da criopreservação.

Para a avaliação da cinética espermática, alíquotas de 250 µL das amostras foram acondicionadas em tubos plásticos (Eppendorfs)⁷, mantidas em banho Maria a 37 °C e avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos através da análise computadorizada do sêmen utilizando o software SCA[®] (*Sperm Class Analyzer* versão 5.0.)⁸. Para a análise no SCA[®], as amostras foram re-diluídas em ACP-102c, de forma a se obter uma concentração espermática final média de 40×10^6 spz/mL.

Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas considerando os seguintes parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60 µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%; linearidade (%), motilidade total (MT%); capturados em três campos.

Para análise subjetiva da motilidade espermática na comparação entre os animais, 10 µL das mesmas amostras utilizadas para analisar no SCA foram analisadas individualmente em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C e avaliadas em microscopia convencional (40x) (Nikon Eclipse 50i)⁹, sempre pelo mesmo avaliador, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A integridade das membranas plasmática (IMP) e a morfologia das células espermáticas foram avaliadas por técnica de coloração de esfregaço utilizando o corante eosina-nigrosina (1 g de

eosina amarela P.A.¹⁰, 2 g nigrosina P.A.¹⁰, 3,57 g de citrato de sódio P.A.¹⁰ e água destilada q.s.p. 100 ml) [4]. Foram avaliados 200 espermatozoides e classificados como íntegros (não corados) e não íntegros (corados) para integridade de membrana e determinado o percentual de espermatozoides íntegros e 200 espermatozoides para avaliação da morfologia, e determinado o percentual de espermatozoides normais.

Avaliação da relação custo-benefício do protocolo de sexagem espermática na espécie ovina

Para avaliação da relação custo-benefício do protocolo de sexagem espermática na espécie ovina foi realizado levantamento bibliográfico para realização do estudo de viabilidade econômica do bioproduto (ACP-102c) e bioprocesso (imunossexagem) e um estudo de mercado de produtos e tecnologias similares.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do software estatístico *R-project*[®] (versão 3.3.2)¹¹, sendo submetidos ao teste de normalidade *Shapiro Wilk* e ao teste de homocedasticidade *Bartlett*. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os parâmetros avaliados para a comparação entre os animais, como para a comparação entre os períodos de descongelamento foram submetidos ao teste *Test T*. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Criopreservação seminal

Quando avaliou-se a variação do efeito do protocolo de imunossexagem entre indivíduos, comparando o sêmen ovino descongelado dos dois animais quantos aos parâmetros de

motilidade total no SCA[®] (Figura 1) motilidade total subjetiva, motilidade progressiva subjetiva, vigor, integridade de membrana plasmática (IMP) e espermatozoides morfolologicamente normais, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0.05$), exceto no parâmetro de espermatozoides normais, no qual o animal A1 apresentou menor percentual ($P < 0.05$) (Tabela 1).

Da mesma forma, ao comparar o período de descongelação das amostras, sete dias e um ano após o dia da criopreservação, com a finalidade de verificar o prazo de validade/viabilidade do sêmen imunossexado e congelado, quanto aos parâmetros motilidade total do SCA[®], motilidade total relativa do SCA[®] e espermatozoides morfolologicamente normais, também não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0.05$) (Tabela 2).

Avaliação da relação custo-benefício do protocolo de sexagem espermática na espécie ovina

Com base no levantamento bibliográfico realizado para o estudo de viabilidade econômica do bioproduto (ACP-102c) e bioprocesso (imunossexagem), e um estudo de mercado de produtos e tecnologias similares, foi observado que a técnica de citometria de fluxo é uma mais laboriosa e de alto custo. Já a imunossexagem associada à criopreservação em diluente ACP-102c demonstrou ser de maior praticidade, tanto entre as técnicas de sexagem espermáticas como entre os diluentes de conservação, apresentando custo inferior ao da citometria de fluxo e uma maior campo de aplicação, apresentando um melhor custo-benefício para a espécie ovina (Tabela 3, 4 e 5).

DISCUSSÃO

No presente estudo, para comparação entre os animais, as amostras foram avaliadas quanto as motilidade, sendo inicialmente pelo sistema SCA e, em seguida, de forma subjetiva. Essa

metodologia foi realizada pois na avaliação do SCA as amostras apresentaram-se com excesso de grumos devido à composição do kit de imunossesagem HY e o uso do crioprotetor (gema de ovo) (Figura 1), dificultando assim a leitura das amostras pelo equipamento, não ocorrendo um leitura fidedigna de todos os parâmetros. Diante disso, como forma de garantir uma maior confiabilidade dos resultados, todas as amostras foram avaliadas simultaneamente de forma subjetiva, sempre pelo mesmo avaliador (Tabela 1).

Os dados de motilidade obtidos no presente trabalho corroboram com os valores mínimos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) [4] para sêmen ovino criopreservado ($\geq 30\%$ de motilidade) (Tabela 1 e 2). Considerando os dados de motilidade com base na proporção relativa, a motilidade seria superior a 70% (Tabela 2). Vale ressaltar que os dados do CBRA são para sêmen criopreservado da forma convencional (não sexado) e, no presente trabalho, foi utilizado sêmen imunossesado.

De uma forma em geral, a qualidade do sêmen sexado criopreservado apresenta-se inferior à do sêmen não-sexado; no entanto, neste estudo, tanto na comparação entre os animais quanto entre o período de avaliação (sete dias e um ano) foram obtidos valores de motilidade espermática acima do recomendado pelo CBRA para sêmen não-sexado e semelhante à diversos sêmens criopreservados não-sexado [3,6,7].

Quanto aos parâmetros de integridade da membrana plasmática, sabe-se que a manutenção de sua integridade é fundamental para a sobrevivência do espermatozoide visto que alterações estruturais podem afetar os mecanismos de osmorregulação, induzir a apoptose e/ou afetar a motilidade [8]. Assim, a avaliação da viabilidade permite predizer sobre a fertilidade das amostras espermáticas, por meio de uma metodologia simples e de baixo custo [9].

No presente estudo, também foi observado que o parâmetro de viabilidade (Tabela 1) nos animais apresentou-se de acordo com o esperado, que seria de aproximadamente 50%. Diante disso, os dados demonstram que a imunossesagem não afetou de forma severa a membrana

espermática, e que o meio de conservação ACP-102c foi eficiente na manutenção da membrana plasmática desses espermatozoides.

A avaliação da morfologia espermática foi o único parâmetro que apresentou diferença estatística, sendo observada apenas entre os animais ($P < 0.05$; Tabela 1), sugerindo que essa diferença pode estar associada ao fator indivíduo e não ao protocolo realizado, o que reforça a condição de que o protocolo de imunossexagem não interfere nas estruturas/composição dos espermatozoides e, conseqüentemente, não interfere na qualidade do sêmen pós-descongelção. Importante ressaltar que o protocolo de congelção iniciou com aproximadamente 50% das células, uma vez que a técnica de imunossexagem causa a “morte” de aproximadamente 50% destes, que seria o correspondente aos espermatozoides portadores do cromossomo X [10]. Logo, considerando os parâmetros de motilidade, viabilidade e morfologia, quase 100% dos espermatozoides que foram sexados se mantiveram viáveis após a congelção-descongelção (Tabela 1 e 2).

Sabe-se que a fertilidade do sêmen sexado é menor que a do sêmen convencional, possivelmente pelo resultado do processo da sexagem por citometria de fluxo, que envolve a exposição do DNA a corantes, raio laser, separação dos espermatozoides em gotículas, altas pressões para passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade em um tubo, permanência por longos períodos em temperatura ambiente e centrifugação, podem interferir na qualidade espermática e conseqüentemente reduzir a sua fertilidade [11]. Outro fator que pode influenciar a fertilidade do sêmen sexado é a menor concentração de espermatozoides por palheta [12].

Diferentes trabalhos comparam o sêmen sexado ao convencional e observaram que o sexado apresenta menor motilidade total, motilidade progressiva, vigor, integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e capacitação prematura [13,14,15]. No entanto, no presente trabalho, o sêmen imunossexado apresentou resultados de motilidade, integridade e morfologia espermática satisfatórios, e semelhantes à trabalhos de

criopreservação de sêmen ovino não-sexado [3,6,7] demonstrando que a técnica de sexagem e meio de conservação empregados no presente trabalho não reduzem a qualidade dos espermatozoides.

Adicionalmente, sabe-se que além de não causar danos aos espermatozoides recuperados, a técnica de seleção espermática ideal deverá ser rápida, fácil e econômica, isolar o maior número possível de espermatozoides móveis, e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculado [16]; características essas observadas na metodologia da imunossexagem.

Na avaliação dos aspectos econômicos (Tabelas 3-5) foi observado que a imunossexagem, associada à criopreservação em diluente ACP-102c, demonstrou ser a técnica de maior praticidade, necessitando apenas de equipamentos convencionais, sendo a que permite uma maior campo de aplicação, uma vez que o sêmen imunossexado pode ser utilizado em fêmeas primíparas e múltíparas [10].

Também foi observado o valor da dose de sêmen nas diferentes moedas comerciais. O valor da dose imunossexada pode custar entre R\$ 94,00 e R\$ 380,00, dependendo da concentração espermática, do número de palhetas produzidas/ejaculado e da genética do reprodutor; praticamente o mesmo valor da dose de sêmen não-sexada (convencional) [17] (Tabela 4). Logo, a utilização da dose imunossexada, com valores próximos à dose não-sexada e garantindo/determinando o sexo da cria antecipadamente, permite uma produtividade mais direcionada, reduzindo os gastos com animais que não seriam de interesse da propriedade, otimizando a produtividade e, conseqüentemente, a lucratividade.

Além disso, apesar do custo do ACP-102c por ejaculado ser superior ao diluente TRIS, a relação custo-benefício dos diluentes favorece o uso do ACP-102c, pois este possui mais componentes (carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, antioxidantes, aminoácidos) que auxiliam na manutenção/conservação dos espermatozoides. Se esses constituintes fossem adicionados ao diluente TRIS, o custo seria muito maior. Além disso, apresenta maior praticidade de

armazenamento e um maior prazo de validade [18]. Desta forma, o custo de produção e venda das doses imunossexadas e criopreservadas em ACP-102c é inferior ao da citometria de fluxo, sendo mais prático que as demais técnicas, apresentando um melhor custo-benefício para a espécie ovina.

CONCLUSÃO

O processo de imunossexagem associado ao uso do diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c) pode ser utilizado para a criopreservação do sêmen da espécie ovina sem distinção de indivíduo e com período de viabilidade/qualidade espermática semelhante ao sêmen convencional não-sexado.

A técnica de imunossexagem associada à criopreservação em diluente ACP-102c apresentou melhor custo-benefício para a espécie ovina, sendo mais prática, de menor custo e com resultados de de qualidade espermática pós sexagem significativos.

MANUFACTURES

¹Sigma-Aldrich Merck KGaA. Darmstadt, Germany.

²HY Biotecnológica. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Kacil Indústria e Comércio Ltda. Recife, PE, Brazil.

⁴ACP Biotecnologia. Fortaleza, CE, Brazil.

⁵Marcolab Agroline Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Campo Grande, MS, Brazil.

⁶IMV Technologies France. L'Aigle, Normandie, France.

⁷Axygen Life Science Corning Inc. New York, USA.

⁸Microptic S.L. Barcelona, Spain.

⁹Nikon Instruments Inc. Tokyo, Japan.

¹⁰ Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Indaiatuba, SP, Brazil.

¹¹The R Foundation. Vienna, Austria.

Acknowledgements. Ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, à Fazenda HCG, ao CNPq, à FUNCAP e à CAPES.

Ethical approval. Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, com protocolo n° 01710545/2019.

Declaration of interest. Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Somente os autores são responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

REFERÊNCIAS

- 1 Johnson L.A. 2000.** Sexing mammalian sperm for production of offspring: state of the art. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 93-107.
- 2 Brito B.F., Santos B.M.B., Maia L.C.P., Matta M.R.F., Nunes J.F. & Salgueiro C.C.M. 2018.** Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 42(3): 99-95.
- 3 Brito B.F., Santos B.M.B., Cabral L.A.R., Lima D.B.C., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2019.** Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservado. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47(1715): 1-7.
- 4 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013.** *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.

- 5 Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P. & Vallet J.C. 1993.** *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*. Nouzilly: FAO, 125p.
- 6 Brito B.F. 2017.** *Criopreservação de sêmen ovino em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) adicionada de óleo de coco extra virgem*. 2017. 64f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 7 Cavalcante J.M.M., Brasil O.O., Salgueiro C.C.M., Salmito-Vanderley S.B. & Nunes J.F. 2014.** Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Ciencia Animal Brasileira*. 15(3): 344-353.
- 8 Cheuquemán C., Faúndez R., Sánchez R. & Risopatrón J. 2018.** Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*. 50:e13080.
- 9 Santos J.F.P., Gosmes E.T., Siqueira A.K.M. & Cardoso R.C.S. 2016.** Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 40(4): 167-179.
- 10 Matta C.G.F. 2003.** *Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento*. 71f. Goyatacazes, RJ. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- 11 Gosálvez J., Ramirez M.A., López-fernández C., Crespo F., Evans K.M., Kjelland M.E. & Moreno J.F. 2011.** Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*. 75: 197-205.
- 12 Liu X., Hu T., Sun W., Hao H., Liu Y. & Zhao, X. 2015.** Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livestock Science*. 181: 263-270.

- 13 Hollinshead F.K., Gillan L., O'Brien J.K., Evans G. & Maxwell, W.M. 2003.** In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction Fertility Development*. 15: 351-359.
- 14 Carvalho J.O., Sartori R., Machado G.M., Mourão G.B. & Dode M.A. 2010.** Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*. 74: 1521-1530.
- 15 Carvalho J.O., Sartori R. & Dode M.A.N. 2014.** Different ways to evaluate bovine sexed sperm in vitro. *Animal Reproduction*. 11: 199-206.
- 16 Henkel R.R. & Schill W.B. 2003.** Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 14: 1-108.
- 17 Machado R., Oliveira J.A.M., Simplicio A.A. & Zagatto L.C.A.G. 1996.** *Custo de Produção de Sêmen Caprino na Central de Inseminação Artificial da Embrap-Cnpc*. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/43419/1/PROCIRM1996.00040.pdf>>. [Accessed online in November 2019].
- 18 Nunes J.F. & Salgueiro C.C.M. 2011.** Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research*. 98:176-184.

LEGENDAS

Figura 1. Captura de imagens do SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*) com grumos.

Tabela 1. Comparação entre animais quanto aos parâmetros de motilidade, integridade de membrana plasmática e morfologia do sêmen ovino imunossexado e descongelado em ACP-102c.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha ($p < 0,05$). MTC = motilidade total no SCA[®]; MTS = motilidade total subjetiva; MPS= motilidade progressiva subjetiva; IMP = integridade de membrana plasmática.

Tabela 2. Comparação entre período de descongelamento (prazo de validade) quanto aos parâmetros de motilidade total e morfologia do sêmen ovino imunossexado e descongelado em ACP-102c.

Valores expressos em médias \pm desvios padrões $P > 0.05$. MTB = motilidade total bruta; MTR = motilidade total relativa.

Tabela 3. Custo de produção dos diluentes de conservação e das técnicas de sexagem espermática.

Tabela 4. Comparativo das técnicas de sexagem/criopreservação de sêmen de pequenos ruminantes.

Tabela 5. Características dos diluentes de conservação ACP-102c e TRIS.

Figura 1. Captura de imagens do SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*) com grumos.

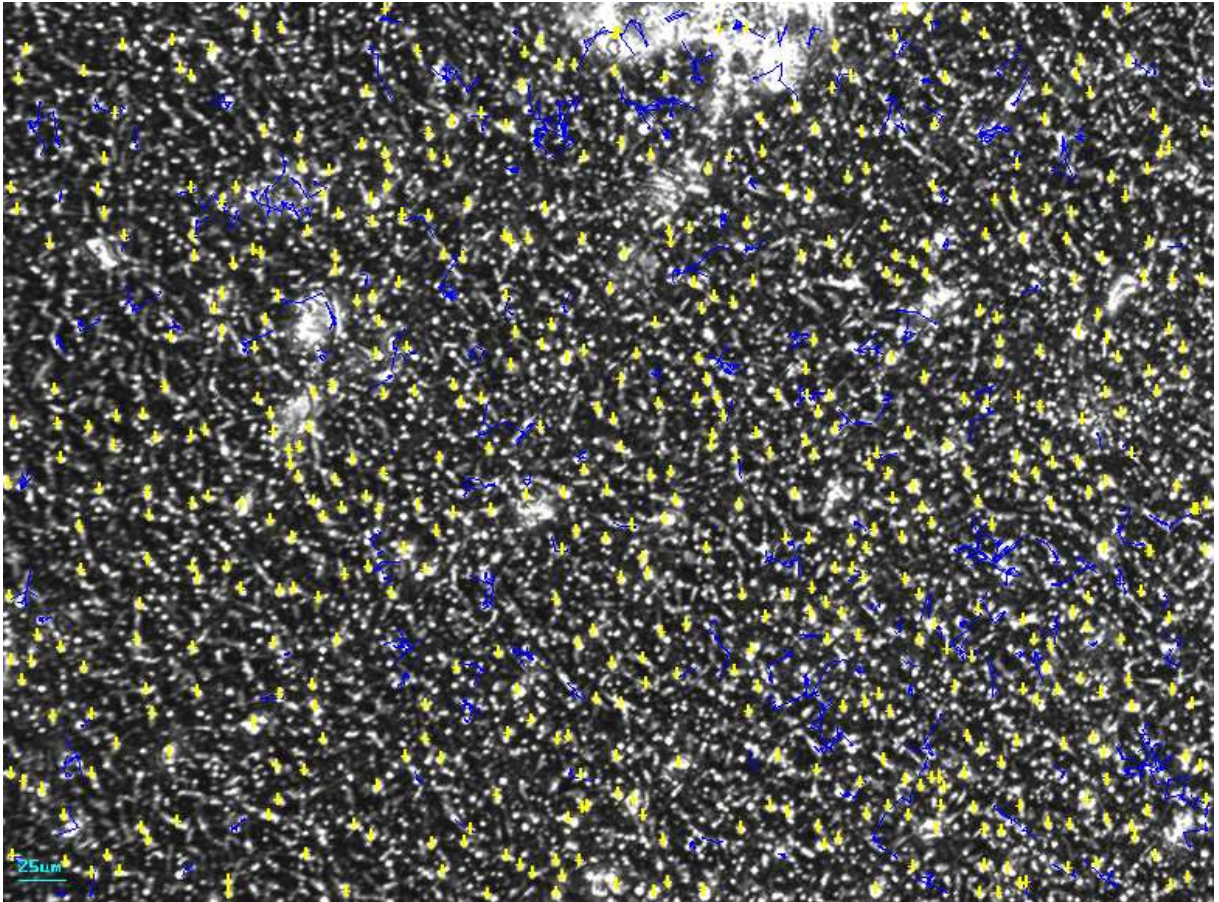


Tabela 1. Comparação entre animais quanto aos parâmetros de motilidade, integridade de membrana plasmática e morfologia do sêmen ovino imunossexado e congelado-descongelado em ACP-102c.

Parâmetros (%)	A1	A2
MTC	35.37 ± 5.46 ^a	42.00 ± 13.94 ^a
MTS	37.50 ± 5.0 ^a	45.00 ± 5.8 ^a
MPS	32.50 ± 9.6 ^a	40.0 ± 11.6 ^a
Vigor	3.50 ± 0.6 ^a	3.25 ± 0.5 ^a
IMP	50.67 ± 22.43 ^a	51.17 ± 36.28 ^a
Espermatozoides normais	89.25 ± 1.0 ^a	94.0 ± 2.2 ^b

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$). MTC = motilidade total no SCA[®]; MTS= motilidade total subjetiva; MPS= motilidade progressiva subjetiva; IMP = integridade de membrana plasmática.

Tabela 2. Comparação entre período de descongelação (prazo de validade) quanto aos parâmetros de motilidade total e morfologia do sêmen ovino imunossexado e congelado-descongelado em ACP-102c.

Parâmetros (%)	2018	2019
MTB (CASA)	38.1 ± 1.83	38.7 ± 4.67
MTR	76.2 ± 3.68	77.4 ± 9.33
Espermatozoides normais	90.00 ± 2.12	88.75 ± 3.18

Valores expressos em médias ± desvios padrões $P > 0.05$. MTB = motilidade total bruta; MTR = motilidade total relativa.

Tabela 3. Custo de produção dos diluentes de conservação e das técnicas de sexagem espermática.

Diluentes de conservação/ Equipamentos/Kit de sexagem	Custo de produção por ejaculado (U\$)
ACP (50 ml)	2,06
TRIS - Tris (Hidroximetil) Aminometano, Frutose e Ácido cítrico (50 ml)	0,48
Citômetro de fluxo	> 411.522,64
Kit Imunossexagem (HY)	2.000,00

Tabela 4. Comparativo das técnicas de sexagem/criopreservação de sêmen de pequenos ruminantes.

	Convencional	Citometria	Imunossexagem
Equipamentos	Simple	Específico/Restrito	Simple
Técnica	Simple	Laboriosa	Simple
Mão de Obra	Tecnificada	Especializada	Tecnificada
Categorias de fêmeas inseminadas	Primíparas e multíparas	Primíparas	Primíparas e multíparas
Valor da dose (dólar)	3 - 25	-	20 - 80
Valor da dose (euro)	10 - 22	-	18 - 73
Valor da dose (real)	115 - 220	-	94 - 380

Tabela 5. Características dos diluentes de conservação ACP-102c e TRIS.

Características	ACP102c	TRIS (Solução estoque)
Composição	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Carboidratos (frutose, glicose, sacarose); ▪ Proteína; ▪ Lipídios (ácidos caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico, linoleico, colesterol); ▪ Vitaminas (B1, B2, B3, B6, C); ▪ Minerais (sódio, cálcio, ferro, fósforo, manganês, magnésio, potássio, selênio, zinco); ▪ Aminoácidos (alanina, arginina, cistina, histidina, leucina, lisina, metionina, tirosina, isoleucina, ácido glutâmico, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, valina) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris (Hidroximetil) Aminometano ▪ Frutose ▪ Ácido cítrico
Armazenamento	Temperatura ambiente (18 – 38°C)	Refrigerado ($\leq 4^{\circ}\text{C}$)
Validade	2 anos	Dias

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sexagem espermática é uma biotécnica importante para a produção animal. Em produções especializadas, de leite ou carne, há um melhor aproveitamento dos animais, prolongamento do uso de matrizes e reprodutores, além de possibilidade de aumentar a produção utilizando menos animais, portanto permite uma criação e produção mais ecológica. Na produção ovina, voltado principalmente para produção de carne no Nordeste do Brasil, a imunossexagem, com seleção de machos, se mostra uma biotécnica promissora para o mercado local.

A imunossexagem se mostra uma técnica eficiente, devido aos custos reduzidos e a praticidade em relação a citometria de fluxo comumente empregada. Neste trabalho, com o emprego da imunossexagem, não houve necessidade do uso de equipamentos caros ou de alta tecnificação, além disso, foi possível utilizar todo o ejaculado do animal, com isso, o sêmen dos animais puderam ser melhor aproveitados. No entanto, ainda são necessários mais estudos e experimentos para adequar o protocolo mais eficiente para a espécie.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P.G.; ALVAREZ, R.H. Métodos de separação de espermatozoides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Boletim de Indústria animal**, v.60, n.1, p.107-115, 2003.
- ALVEZ, F.S.F.; HOLANDA JÚNIOR, E.V.; LOPES, R.S. **Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasília: MAPA, 2009. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11427/1/CL09007.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2019.
- ARO, D.T.; POLIZER, K.A.; PENA, S.B. **O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n.7, 2008. Disponível em: < http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/vLddlrFZtwpYw35_2013-5-21-15-49-21.pdf>. Acesso em: 11 out 2019.
- ARRUDA, R.P. *et al.* Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- BAILEYET, J. L.; BILODEAUB, J. F. O.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BARIL, G. *et al.* **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins**, p.121-170, 1993.
- BISPO, C.A.S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- BRITO, B.F. **Criopreservação de sêmen ovino em meio à base de água de coco em pó (ACP-102c) adicionada de óleo de coco extra virgem**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.
- BRITO, B.F. *et al.* Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42,n.3-4, p.90-95, 2018.
- BRITO, B.F. *et al.* Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.47, supl.1715, p.1-7, 2019.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, 2011.

CÂMARA, T.S. **Diversidade genética e criopreservação do sêmen de caprinos das Alpina Britânica e Canindé no Nordeste Brasileiro**. 2017. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em:<
http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/TalitaSoares_Tese.pdf>. Acesso em: 15 out. 2019.

CARDOSO, J.F.S. **Uso do diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®) para o resfriamento a 4°C do sêmen canino**. 2006. 68f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

CARVALHO, J.O. *et al.* Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.74, p.1521–1530, 2010.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; DODE M.A.N. Different ways to evaluate bovine sexed sperm in vitro. **Animal Reproduction**, v.11, p.199–206, 2014.

CARVALHO, J.O. *et al.* Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, v.207, p.30-37, 2018.

CATT, S.L. *et al.* The birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive “male” sperm. **Veterinary Record**, v.139, p.494-495, 1996.

CAVALCANTE, J.M.M. **Proteínas do plasma seminal na criopreservação do sêmen ovino em água de coco em pó (ACP-102c) ou tris**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará.

CAVALCANTE, J.M.M. *et al.* Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 344–353, 2014.

CAVALCANTE, T.V.; ESPER, C.R.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M.F.. Análise computadorizada (casa) e convencional da motilidade espermática de sêmen caprino das raças Boer e Alpina no outono e primavera. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 21, Suplemento, p.203-208, 2005.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 104 p

CHEMINEAU, P. *et al.* **Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1991, 223p.

CHEUQUEMÁN, C.; FAÚNDEZ, R.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN J. Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa.

Andrologia, v.50, p.e13080, 2018.

CRAN, D.G. *et al.* Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization. **Veterinary Record**, v.132, p.40-41, 1993.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragoza, Editora Acribia, 1980. 446p.

FARSTAD, W. Sêmen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p.277-284, 1977.

FREITAS-DELL'AQUA *et al.* Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.213-222, 2009.

FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL. **Ovinocultura: Desenvolvimento Regional Sustentável**. Brasília: Banco do Brasil, v.7, 2010. Disponível em:

<<http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol7OvinocapriCult.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

GARNER, D.L. *et al.* Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.28, p.312-321, 1983.

GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.943-957, 2006.

GOLDBERG, E.H. *et al.* Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. **Nature**, v.232, p. 478-480, 1971.

GOMES, G. M.; CRESPILO, A.; GOMES, L. M. Relating problem to cooled semen of stallion. **Revista Saúde**, v. 04, n. 1, p. 25-28, 2015.

GOSÁLVEZ, J. *et al.* Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. **Theriogenology**, v.75, p.197-205, 2011.

HENDRIKSEN, P.J.M. DO X AND Y SPERMATOZOA DIFFER IN PROTEINS? **Theriogenology**, v. 52, n. 99, p. 1295–1307, 1999.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.14, p.1–108, 2003.

HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production.

Theriogenology, v. 52, n. 8, p. 1421-33, 1999.

HOLLINSHEAD, F.K. *et al.* In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing.

Reproduction Fertility Development, v.15, p.351–359, 2003.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira De Zootecnia**, p. 219–228, 2007.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. *et al.* Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1680-1685, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2015. **Produção da Pecuária Municipal**, v.43, p1-49, 2015.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2018**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

JOHNSON, L.A.; CRAN, D.G.; POLGE, C. Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- & Y chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. **Theriogenology**, v.41, p.51-56, 1994.

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

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: state of the art. **Anim. Reproduction Science**, v.60-61, p.93-107, 2000.

LIU, X. *et al.* Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. **Livestock Science**, v.181, p.263-270, 2015.

MACHADO, R. *et al.* **Custo de Produção de Sêmen Caprino na Central de Inseminação Artificial da Embrapa-Cnpq**. 1996. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/43419/1/PROCIRM1996.00040.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

MATTA, C.G.F. **Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento**. 2003. 71f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

MATTA, M.F.R. Método para sexagem de espermatozoides usando a via clássica do sistema complemento, com eliminação da via alternativa pela inativação da proteína “b”. 2000. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Patente N/Ref.: PI 0005045-8 A2. Disponível em: < <https://www.escavador.com/patentes/481580/metodo-sexagem-espermatozoides-usando-via-classica-sistema-complemento-com>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

MATTA, M.F.R. **A method of enriching spermatozoa of mammals bearing X-chromosome or Y-chromosome**. 2016. European Patent Office, Paris. Patente N/Ref.: EP2402757B1.

MELO, C.C.S. **Conservação de sêmen caprino a 4 °C utilizando ACP-101 com duas concentrações de Aloe vera ou gema de ovo**. 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, Ceará, 2010.

MELO-MACIEL, M.A.P. *et al.* Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 945-9, 2015.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. 6ª edição, Porto Alegre: Sulina, 1987.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 109-12, 1998.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p.176-184, 2011.

PASCARELLI SOUZA, C.J. *et al.* Monoclonal Antibody against Male-Specific Protein of 19 KDa from Bovine Spermatozoa: A Successful Methodology for Immunosexing. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 1, p. 74–78, 1999.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

SALGUEIRO, C.C.M. *et al.* Utilização de diluentes a base de água de coco “*in natura*” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl 5, p. 96-8, 2002.

SANTOS, J.F.P.; GOSMES, E.T.; SIQUEIRA, A.K.M.; CARDOSO R.C.S. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, p.167-179, 2016.

SCOTT, C. *et al.* Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, v.25, p.021-029, 2018.

SEIDEL, G.E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 443-6, 2007.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista de Brasileira Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-84, 2011.

SIMPLÍCIO, A.A. A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 24, p. 15-18, 2001.

SOUSA, M.S. **Sincronização do estro e inseminação artificial de ovelhas utilizando água de coco em pó**. 2016. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/MarcimarSousa_Dissertação.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2019.

TILBURG, M.F.V. *et al.* Identificação de antígeno macho-específico de ovino Identification of ovine male specific antigen. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 231–233, 2006.

TONIOLLI, R. *et al.* Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 5 °C no diluente ACP-103® associado à gema de ovo. **Ciência Animal (UECE)**, v. 23, p. 45-57, 2013.

UCHOA, D.C. *et al.* Inseminação artificial com sêmen refrigerado diluído em água de coco em pó (ACP-106c®) favorece o nascimento de fêmeas na raça Buldogue Francês. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, Supl. 2, p. 692, 2010.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved Semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p. 481-492, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Silas Munguba, 1700 - Itaperi CEP 60740-903 - fone 3101-9890 ceua_uece@uece.br - www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação</small>
--	--	---

CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado **"Imunosexagem de espermatozoides de ruminantes diluídos em melo a base de água de coco em pó"** registrado sob o **01710545/2019**, tendo como pesquisador principal **José Ferreira Nunes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA - UECE)**. Este certificado expira-se em 31 de agosto 2023.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled **"Imunosexagem de espermatozoides de ruminantes diluídos em melo a base de água de coco em pó"** registered with the protocol **01710545/2019** under the supervision of **José Ferreira Nunes** is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA - UECE). This certificate will expire on August 31st, 2023.

RESUMO

Vigência do projeto	Abril de 2016 a dezembro de 2022
Espécie/inhegem	Bovina/caprino/ovino
Número de animais	103/55/53
Pesoidade	- 900-1000 kg/3 a 8 anos - 70 kg/2 a 5 anos - 80 kg/2 a 5 anos
Sexo	- 3 machos e 100 fêmeas - 5 machos e 50 fêmeas - 3 machos e 50 fêmeas
Origem	- Propriedades rurais - Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da FAVET/UECE

Fortaleza, 26 de abril de 2019.


Maria Brivalda Farias de Aragão
 Presidente CEUA-UECE

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo

ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE

[HOME](#)
[ABOUT](#)
[USER HOME](#)
[SEARCH](#)
[CURRENT](#)
[ARCHIVES](#)
[ANNOUNCEMENTS](#)
[INSTRUCTIONS](#)
[ONLINE SUBMISSION](#)

Home > User > Author > Active Submissions

ACTIVE SUBMISSIONS

[ACTIVE](#)
[ARCHIVE](#)

ID	MM-DD SUBMIT	SEC	AUTHORS	TITLE	STATUS
101058	16/03/2020		Nunes, Maia, Brito, Santos, Cabral,...	ASPECTOS ECONÔMICOS E AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE VIABILIDADE...	Awaiting assignment

1 - 1 of 1 Items

START A NEW SUBMISSION

[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

ISSN: 1679-9216