

Sêmen ovino e caprino imunossexado e diluído em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP101/102c)

Ram and Goat Semen Immunosexed and Diluted in Powdered Coconut Water-Based Preservation Medium (ACP101/102c).

Bruna Farias Brito¹, Bárbara Mara Bandeira Santos², Leonardo Alves Rodrigues Cabral¹, Luiz Carlos Pinheiro Maia³, Natanael Aguiar Braga Negreiros¹, Herlon Victor Rodrigues Silva¹, Marcos Fernando de Resende Matta⁴, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro³ & José Ferreira Nunes¹

ABSTRACT

Background: Sperm sexing aims to separate sperm populations in carriers of the “X” or “Y” chromosome. Currently, flow cytometry is a technique that allows greater accuracy; however, it causes structural changes in sperm, reduces viability, and has a high cost. As a result, other methods have been researched, including immunosexing, which uses monoclonal antibodies to detect sex-specific surface antigens. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunosexing technique using a monoclonal antibody against sex-specific protein (HY) in the conservation of ram and goat semen in ACP101/102c.

Materials, Methods & Results: Ejaculates from five rams and five goats were collected with the aid of an artificial vagina; they were 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 ram (ACP101/102c + 20% egg yolk + 7% glycerol) and ACP goat (ACP101/102c + 2.5% egg yolk + 7% glycerol), packaged in 0.25 mL straws, refrigerated at 4°C, stabilized for 30 min, frozen in liquid nitrogen vapor (-60°C) for 15 min, immersed in liquid nitrogen, and stored in cryogenic cylinders. The samples were evaluated *in natura* (T1), after immunosexing (T2) and after thawing (T3) for sperm motility subjectively 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 morphologically defect spermatozoa were determined. In the evaluation of ram semen regarding sperm motility and IMP, no statistically significant differences were observed between treatments after sexing in the evaluation of absolute data ($P > 0.05$), with the difference being observed only between T1 and T2, and T3 ($P < 0.05$). Regarding the relative percentage and sperm morphology, no statistically significant differences were observed ($P > 0.05$). Regarding the evaluation of goat semen samples, the motility parameters were consistent with the technique submitted; however, the IMP data did not appear as expected, requiring further evaluation for a better assessment of the technique for this species.

Discussion: The data obtained from ram semen submitted to the immunosexing protocol, regarding the absolute evaluation of motility and IMP, demonstrated that the non-sexed semen (T1) was superior to the sexed treatments (T2 and T3); however, it is noteworthy that freezing started with approximately 50% of the cells, since the immunosexing technique results in a loss of viability of approximately 50% of the sperm, which corresponds to the ratio of sperm carrying the X chromosome. In addition, when the data in this study were transformed into relative values, no statistical differences were observed, indicating that the immunosexing protocol, as well as the freezing protocol, did not significantly affect the quality of ram sperm cells. In relation to the immunosexing of goat semen, future studies should be conducted *in vitro* to define a more appropriate protocol for the species and, in addition, *in vivo* studies should be performed to prove the quality of the technique. It was concluded that the immunosexing process using a monoclonal antibody against sex-specific protein (HY) associated with the use of powdered coconut water diluent (ACP101/102c) in the cryopreservation of semen proved to be efficient in the *in vitro* evaluation of ovine species.

Keywords: ruminant, sexing, antibody, water coconut, freezing.

Descritores: ruminantes, sêmen, congelamento, anticorpo monoclonal, coco.

DOI: 10.22456/1679-9216.114066

Received: 15 May 2021

Accepted: 25 June 2021

Published: 2 August 2021

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV); ²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) & ³Programa de Pós-Graduação Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (PPGBIOTEC), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. CORRESPONDENCE: J.F. Nunes [ferreira.nunes@uece.br]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária - UECE. Av. Dr. Silas Munguba n.1700. CEP 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a ovinocaprinocultura tem sua importância econômico-social apresentando-se como alternativa na oferta de carne, leite e derivados, e vem crescendo e exigindo uma maior organização, produção com qualidade e segurança alimentar [1]. Como solução para a melhoria na qualidade desses rebanhos, o melhoramento genético tem-se apresentado como a principal base para o seu desenvolvimento [15,16].

Considerando os diferentes tipos de criações, biotecnológicas têm sido desenvolvidas, dentre elas, a sexagem espermática, que visa separar os espermatozoides portadores do cromossomo “X” ou “Y” [9]. A sexagem, associada à inseminação artificial, propiciará a maximização da produtividade nos programas de cruzamento, possibilitando maior proporção de animais do sexo desejado e considerando as diferentes necessidades de bezerros machos ou fêmeas para criadores de gado de corte ou leite [18].

A citometria de fluxo ainda é a técnica de sexagem que permite maior acurácia e a mais utilizada, no entanto, causa alterações estruturais nos espermatozoides, o que ocasiona redução de sua viabilidade e requer equipamentos de alto custo [4].

Desta forma, outros métodos têm sido pesquisados para oferecer uma alternativa a todos os produtores, objetivando sexar o sêmen com menores custos e maior praticidade. Dentre elas, a imunossexagem, uma técnica que utiliza anticorpo monoclonal para detecção de antígenos de superfície sexo-específicos [15,16].

Assim, objetivou-se avaliar a imunossexagem por meio do anticorpo monoclonal contra proteína sexo-específica (HY) associada à via clássica do sistema complemento na conservação de sêmen caprino e ovino em meio à base de água de coco em pó (ACP101/102c).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e controle de qualidade do sêmen

Ejaculados de 5 caprinos e de 5 carneiros foram coletados com o auxílio de uma vagina artificial adequada à espécie. Após as coletas, as amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria a 35°C e avaliadas quanto ao volume (mL), motilidade massal (0 a 5), motilidade total e concentração [6,7]. Somente ejaculados com volume superior a 0,5 mL, motilidade massal ≥ 3 (ovinos) e ≥ 4 (caprino), motilidade total $\geq 80\%$ e a concentração $\geq 2 \times 10^9$ spz/mL foram utilizados para o experimento [7].

Imunossexagem e congelamento do sêmen

Em cada coleta dos ovinos, os ejaculados foram submetidos ao protocolo de imunossexagem, os quais foram inicialmente diluídos em DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)¹ na proporção de 1:14, centrifugados a 600 g por 10 min e retirado o sobrenadante. O “pellet” foi ressuscitado em 2,5 mL de anticorpo HY (Anti-HY)², adicionado 12,4 mL de DPBS e 100 μ L do complemento, e mantido em banho-maria a 35°C por 1 h. Após o período de incubação, a amostra foi novamente centrifugada a 600 g por 10 min, retirado o sobrenadante e adicionado o diluente de criopreservação a base de água de coco em pó (ACP)³: ACP101/102c + 20% gema de ovo + 7% glicerol, obtendo uma concentração final de 200×10^6 spz/mL.

Em cada coleta dos caprinos, os ejaculados foram submetidos ao protocolo de imunossexagem, os quais foram inicialmente diluídos em ACP101/102c na proporção de 1:14, centrifugados a 600 g por 10 min e retirado o sobrenadante. O “pellet” foi ressuscitado em 2,5 mL de anticorpo HY, adicionado 12,4 mL de ACP101/102c e 100 μ L do complemento, e mantido em banho-maria a 35°C por 1 h. Após o período de incubação, a amostra foi novamente centrifugada a 600 g por 10 min, retirado o sobrenadante e adicionado o diluente de criopreservação: ACP101/102c + 2,5% gema de ovo + 7% glicerol, obtendo uma concentração final de 200×10^6 spz/mL.

Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL 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 vapor de nitrogênio por 15 min, a uma altura de 4 cm (ovinos) e 5 cm (caprinos) do nitrogênio líquido, e então imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos.

Avaliação in vitro do sêmen

O sêmen foi avaliado após a coleta (T1 - não sexado), o protocolo de imunossexagem (T2 - sexado) e a congelamento (T3 - sexado/congelado). As amostras criopreservadas foram descongeladas, após um intervalo mínimo de 7 dias da coleta, em banho-maria (Bivolt BM02)⁴ a 37°C por 30 s, acondicionadas em microtubos (eppendorfs)⁵ e incubadas por 5 min em banho-maria a 37°C.

Para a avaliação das amostras, alíquotas de 100 μ L das amostras foram acondicionadas em microtubos,

mantidas em banho-maria a 37°C e avaliadas quanto a motilidade, integridade de membrana e morfologia espermática.

Avaliação da motilidade espermática

Uma vez que as coletas eram realizadas a campo, as amostras foram avaliadas quanto a motilidade do sêmen fresco não sexado (T1), após sexagem (T2) e descongelado (T3) de forma subjetiva, utilizando 10 µL de cada amostra e analisadas individualmente em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C e avaliadas em microscopia convencional (40x), sempre pelo mesmo avaliador, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Avaliação da integridade de membrana e da morfologia espermática

A integridade de membrana e a morfologia foi avaliada pela técnica de coloração de esfregaço utilizando o corante eosina-nigrosina (1 g de eosina amarela P.A.6 / 2 g nigrosina P.A.6 / 3,57 g de citrato de sódio P.A.6 e água destilada q.s.p. 100 mL) [5]. Foram confeccionados esfregaços em lâmina pré-aquecida a 37°C utilizando 5 µL do corante eosina-nigrosina adicionado de 5 µL do sêmen rediluído. Para viabilidade, foram contadas 200 células espermáticas e classificadas em viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas), já para a morfologia espermática, foram contadas 200 células espermáticas e classificadas em normais, defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda e presença de gota citoplasmática.

Análise estatística

Para a avaliação absoluta foram utilizados os dados brutos, considerando todas as células das amostras. Já para avaliação relativa, foi feito o cálculo de

proporção considerando que os 50% após a sexagem seriam o valor total.

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prisma versão 5.0 (versão 5.01)⁷. Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade Bartlett's e ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, as proporções encontradas para os parâmetros espermáticos foram submetidas à ANOVA seguidas pelo teste de Tukey. Os dados obtidos foram expressos em média e erro padrão e considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo, no tocante a avaliação das amostras de sêmen ovino quanto a motilidade espermática [Tabela 1] e a integridade de membrana plasmática [Tabela 2] não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos após a sexagem (T2 e T3) na avaliação dos dados absolutos/brutos ($P > 0,05$), sendo observada a diferença apenas entre o não sexado (T1) e o sexado (T2 e T3) [$P < 0,05$]. Quando comparado os dados transformados em percentual relativo, não foi observada nenhuma diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Em relação a avaliação da morfologia espermática não foi observada nenhuma diferença estatística significativa ($P > 0,05$) [Tabela 3].

Em relação a avaliação das amostras de sêmen caprino submetidos ao protocolo de imunossexagem, os parâmetros de motilidade apresentaram-se condizentes com a técnica submetida, entretanto, os dados obtidos do parâmetro integridade de membrana não se apresentaram conforme esperado, sendo necessário outras avaliações para melhor avaliação da técnica para esta espécie, desta forma, não sendo apresentados no presente trabalho.

Tabela 1. Motilidade de sêmen ovino não sexado (T1), imunossexado (T2) e imunossexado/criopreservado (T3) em ACP102c (Média ± EP).

Parâmetro	Absoluta	Relativa
T1	90,0 ± 0,0 ^a	90,0 ± 0,0 ^a
T2	41,9 ± 1,9 ^b	83,8 ± 3,8 ^a
T3	36,1 ± 2,3 ^b	72,2 ± 4,7 ^a

^{a,b}Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 2. Integridade de membrana plasmática do sêmen ovino não sexado (T1), imunossexado (T2) e imunossexado/criopreservado (T3) em ACP101/102c (Média ± EP).

Parâmetro	Absoluta	Relativa
T1	80,5 ± 1,0 ^a	80,5 ± 1,0 ^a
T2	32,5 ± 4,4 ^b	65,0 ± 8,7 ^a
T3	32,6 ± 5,2 ^b	65,3 ± 10,3 ^a

^{a,b}Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 3. Morfologia espermática absoluta de sêmen ovino não sexado (T1), imunossexado (T2) e imunossexado/criopreservado (T3) em ACP101/102c (Média ± EP).

Parâmetro	T1	T2	T3
Normal	83,5 ± 0,9	82,0 ± 1,1	85,2 ± 3,1
Acrossoma	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cabeça	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
PI	5,5 ± 1,9	8,5 ± 0,7	4,2 ± 1,0
Cauda	8,5 ± 0,7	9,5 ± 0,5	7,8 ± 2,3
GP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

P > 0.05. PI: Peça intermediária; GP: Gota citoplasmática.

DISCUSSÃO

No presente estudo, quanto aos dados obtidos do sêmen ovino submetido ao protocolo de imunossexagem, observou-se que os dados absolutos de motilidade e integridade de membrana plasmática do sêmen não sexado (T1) foi superior aos tratamentos sexados (T2 e T3), no entanto, vale ressaltar que o protocolo de congelamento iniciou com aproximadamente 50% das células, uma vez que a técnica de imunossexagem causa uma perda esperada da viabilidade de aproximadamente 50% dos espermatozoides do ejaculado, que seria o correspondente aos espermatozoides portadores do cromossomo X [15,16].

Além disso, sabe-se que o sêmen submetido a protocolo de refrigeração e congelamento também apresentam uma redução da qualidade espermática quando comparado ao sêmen in natura. Entretanto, quando os dados deste estudo foram transformados em relativos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, indicando que o protocolo de imunossexagem, bem como o de congelamento não afetaram significativamente a qualidade das células espermáticas ovinas.

Estudos comparando o sêmen sexado ao convencional, observaram que o sexado apresenta menor motilidade, integridade de membranas, potencial mitocondrial e capacitação prematura, o que afeta diretamente no resultado da fertilidade do sêmen sexado [2,3,11]. Essa redução da qualidade e da fertilidade espermática do sêmen sexado, de uma forma em geral, está associada ao protocolo da sexagem por citometria de fluxo, que envolve a exposição do DNA a corantes, raio laser, altas pressões para passagem pelo citômetro, queda em grande velocidade em um tubo, permanência por longos períodos em temperatura ambiente e centrifugação, o que resulta em baixas concentrações de espermatozoides viáveis por palhetas [12].

A taxa de fertilização do sêmen comercialmente sexado é inferior às taxas obtidas após inseminação artificial com sêmen não sexado, sendo essa diminuição atribuída, justamente, dois terços a menor concentração espermática por dose de sêmen sexado e um terço ao processo de sexagem [8,10]. Já o protocolo de sexagem realizado na espécie ovina no presente estudo não afetou de maneira significativa nenhum dos parâmetros avaliados, demonstrando manter a qualidade e a concentração espermática, utilizando uma metodologia fácil de executar e sem grandes danos para espermatozoide, uma vez que consiste apenas em remover o plasma seminal e incubar com o anticorpo monoclonal contra a proteína sexo-específica (HY) associada à via clássica do complemento. Isso permite a capacidade de confeccionar palhetas de sêmen sexado com a mesma concentração utilizada para IA com doses convencionais não sexadas, minimizando a redução da fertilidade. Estudo em bovinos e ovinos utilizando doses de sêmen imunossexado com dose inseminante semelhante ao convencional não foram observadas diferença quanto à taxa de prenhez quando comparada ao sêmen não sexado e obtiveram taxas de sexagem entre 70-80% [17].

Além disso, estudo de viabilidade econômica avaliando os custos de produção de doses de sêmen ovino imunossexado, demonstrou que a imunossexagem é a técnica de maior praticidade, necessitando apenas de equipamentos convencionais (centrífuga e banho-maria), obtendo doses com o valor entre R\$ 94,00 e R\$ 380,00, valores aproximados aos encontrados no mercado para sêmen não sexado da espécie [13,14].

No tocante a espécie caprina, nos testes iniciais utilizando o DPBS, observou uma toxicidade da célula espermática a este meio tamponante, onde após a realização do protocolo quase 100% das células

apresentavam-se imóveis. Desta forma, considerando a composição do plasma seminal dos caprinos e a composição da água de coco em pó (ACP101/102c), optou-se por repetir os testes utilizando o diluente ACP101/102c como meio tamponante para o protocolo de imunossexagem em caprinos. Com esta nova metodologia proposta, observou uma possível ação do protocolo de imunossexagem no parâmetro de motilidade, entretanto, no parâmetro de integridade de membrana, não foram observadas diferenças significativas entre os dados do sêmen não sexado e o imunossexado.

Logo, considerando os resultados favoráveis da qualidade *in vitro* do sêmen ovino imunossexado, estudos futuros devem ser realizados para avaliar *in vivo* e comprovar a qualidade do sêmen imunossexado através das taxas de prenhez, parição e qualidade das crias nascidas na espécie ovina. Já em relação à imunossexagem do sêmen caprino, estudos futuros devem ser realizados *in vitro* para definir um protocolo mais adequado à espécie e posteriormente realizar os estudos *in vivo* para comprovar a qualidade da técnica.

CONCLUSÃO

O processo de imunossexagem por meio do anticorpo monoclonal contra proteína sexo-específica

(HY) associada à via clássica do sistema complemento associado ao uso do diluente à base de água de coco em pó (ACP101/102c) na criopreservação do sêmen mostrou-se eficiente na avaliação *in vitro* para a espécie ovina.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich Merck KGaA. Darmstadt, Germany.

²HY Biotechnology. Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ACP Biotecnologia. Fortaleza, CE, Brazil

⁴Kacil Indústria e Comércio Ltda. Recife, PE, Brazil.

⁵Axygen Life Science Coming Inc. New York, USA.

⁶Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Indaiatuba, SP, Brazil.

⁷GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA.

Acknowledgements. To the Goat and Ram Semen Technology Laboratory of the State University of Ceará, the Physics Department of the Federal University of Ceará, the ACP Biotechnology and HY Biotechnology companies, and the HCG, VetCampo and Guaiúba agricultural properties, CNPq, FUNCAP and the CAPES.

Ethical approval. This research was conducted after evaluation and approval by the Ethics Committee for the Use of Animals at the State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, with protocol number 01710545/2019.

Declaration of interest. The authors declare no conflicts of interest. Only the authors are responsible for the content and writing of the article.

REFERENCES

- 1 Alves F.S.F., Holanda Júnior E.V. & Lopes R.S. 2009.** *Produção Integrada no Brasil: Agropecuária Sustentável Alimentos Seguros*. Brasília: MAPA 2009. 1008p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11427/1/CL09007.pdf>>. [Accessed online in July 2018].
- 2 Carvalho J.O., Sartori R. & Dode M.A.N. 2014.** Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. *Animal Reproduction*. 11(3): 199-206.
- 3 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(9): 1521-1530.
- 4 Carvalho J.O., Sartori R., Rodello L., Mourão G.B., Bicudo S.D. & Dode M.A.N. 2018.** Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. *Livestock Science*. 207(2018): 30-37.
- 5 Celeghini E.C.C., Arruda R.P., Andrade A.F.C., Nascimento J. & Raphael C.F. 2007.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(5): 479-488.
- 6 Chemineau P., Caignie Y., Guerin Y. & Orgeus P. 1991.** *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 223p.
- 7 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013.** Ovino, Caprino. In: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual Para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal*. Belo Horizonte: CBRA, pp.35-42.
- 8 Frijters A.C.J., Mullaart E., Roelofs R.M.G., Van Hoorne R.P., Moreno J.F., Moreno O. & Merton J.S. 2009.** What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*. 71(1): 64-67.

- 9 **Garner D.L. 2006.** Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*. 65(5): 943-957.
- 10 **Garner D.L., Evans K.M. & Seidel G.E. 2013.** Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods in Molecular Biology*. 927: 279-295.
- 11 **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, and Development*. 15(6): 351-359.
- 12 **Liu X., Hu T., Sun W., Hao H., Liu Y., Zhao X., Zhu H. & Du W. 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 **Machado R., Oliveira J.A.M., Simplício A.A. & Zagatto L.C.A.G. 1996.** Custo de produção de sêmen caprino na central de Inseminação artificial da Embrapa-CNPC. Brasília: Embrapa Caprinos e Ovinos, 3p. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/43419/1/PROCIRM1996.00040.pdf>>. [Accessed online in November 2019].
- 14 **Maia L.C.P., Brito B.F., Santos B.M.B., Cabral L.A.R., Salgueri C.C.M., Matta M.F.R. & Nunes J.F. 2020.** Aspectos econômicos e avaliação do período de viabilidade de espermatozoides ovino imunossexados e diluídos em meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Acta Scientiae Veterinariae*. 48: 1740.
- 15 **Matta C.G.F. 2003.** Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento. 55f. Goytacazes, RJ. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- 16 **Matta M.F.R. 2016.** A method of enriching spermatozoa of mammals bearing X-chromosome or Y-chromosome. European Patent Office. Paris. Patente N/Ref.: EP2402757B1.
- 17 **Santos B.M.B. 2020.** Bioprocesso de imunossexagem espermática em bovinos e ovinos de corte. 91f. Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste em Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará.
- 18 **Souza C.J.P., Matta M.F.Rd, Cruz G.M., Alves E.W., Kanashiro M.M. & Silva J.F.S. 1999.** Monoclonal antibody against male-specific protein of 19 KDa from bovine spermatozoa: A successful methodology for immunosexing. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 28(1): 74-78.