



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)

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}

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, antibody, sperm sexing, ACP-102c, freezing.

Descritores: semen, antibodies, cell separation, cryopreservation, sheep.

DOI: 10.22456/1679-9216.101058

Received: 18 March 2020

Accepted: 17 May 2020

Published: 20 June 2020

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, CE, Brazil. ⁴Centro de Biociência e Biotecnologia, Universidade 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

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 [13].

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 imunosexagem utilizando anticorpo monoclonal para detectar antígenos de superfície sexo-específicos, já sendo bastante promissora na bovinocultura e na suinocultura [4].

Em ovinos, também tem se destacado o uso meio de conservação à base de água de coco (diluente) em pó (ACP-102c). 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 à técnica de imunosexagem seguida de criopreservação em ACP-102c e seus aspectos econômicos quanto ao sêmen de ovino.

MATERIAIS 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) [9]. 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 con-

centração espermática ($1-3 \times 10^9$ spz/mL) determinada em câmara de Neubauer [9].

Imunossexagem e criopreservação seminal

Os ejaculados foram submetidos ao protocolo de imunosexagem, os quais foram inicialmente diluídos em D-PBS (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 ressuspensionado em 2,5 mL de anticorpo (Anti-HY)², adicionado de 12,4 mL de D-PBS e 100 μ L 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 600 g 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 s, 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 μ L 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: 30 µm/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) [9]. 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 ± desvio padrão. Os parâmetros avaliados para a comparação entre os animais, como para a comparação entre os períodos de descongelamento foram submetidos ao teste *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, com-

parando o sêmen ovino descongelado dos dois animais quanto aos parâmetros de motilidade total no SCA[®] (Figura 1) motilidade total subjetiva, motilidade progressiva subjetiva, vigor, integridade de membrana plasmática (IMP) e espermatozoides morfologicamente 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 descongelamento 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 morfologicamente 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 (Tabelas 3, 4 e 5).

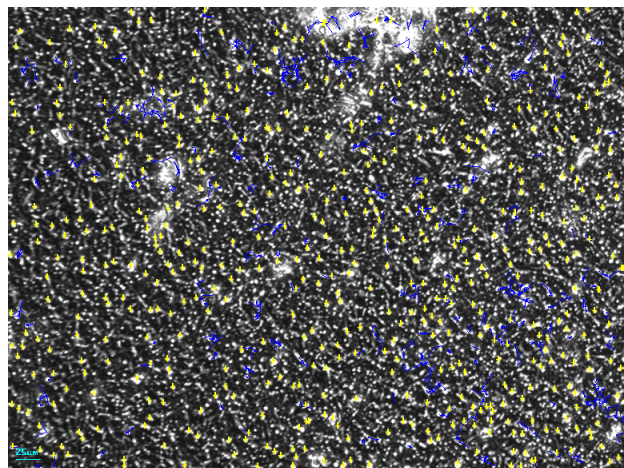


Figura 1. Captura de imagens do SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*) com grumos.

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.

Parâmetro (%)	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 descongelado em ACP-102c.

Parâmetro (%)	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 (US)
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.

Parâmetro	Convencional	Citometria	Imunossexagem
Equipamentos	Simples	Específico/Restrito	Simples
Técnica	Simples	Laboriosa	Simples
Mão de Obra	Tecnificada	Especializada	Tecnificada
Categorias de fêmeas inseminadas	Primíparas e múltíparas	Primíparas	Primíparas e múltíparas
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.

Característica	ACP102c	TRIS (Solução estoque)
Composição	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Carboidratos (frutose, glicose, sacarose); <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína; ▪ Lipídios (ácidos caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico, linoleico, colesterol); <ul style="list-style-type: none"> ▪ 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 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Frutose ▪ Ácido cítrico
Armazenamento	Temperatura ambiente (18 - 38°C)	Refrigerado ($\leq 4^\circ\text{C}$)
Validade	2 anos	Dias

DISCUSSÃO

No presente estudo, para comparação entre os animais, as amostras foram avaliadas quanto à 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 imunossexagem HY e o uso do crioprotetor (gema de ovo) [Figura 1], dificultando assim a leitura das amostras pelo equipamento, não ocorrendo uma 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) [9] para sêmen ovino criopreservado (> 30% de motilidade) [Tabelas 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 imunossexado.

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 [2,3,7].

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 prever sobre a fertilidade das amostras espermáticas, por meio de uma metodologia simples e de baixo custo [18].

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 imunossexagem 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-descongelamento.

Importante ressaltar que o protocolo de congelamento 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 [16]. Logo, considerando os parâmetros de motilidade, viabilidade e morfologia, quase 100% dos espermatozoides que foram sexados se mantiveram viáveis após a congelamento-descongelamento (Tabelas 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 [10]. Outro fator que pode influenciar a fertilidade do sêmen sexado é a menor concentração de espermatozoides por palheta [14].

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 [5,6,12]. 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 [2,3,7]

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 [11]; 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 múltiparas [16].

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) [15] (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 [17]. 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 qualidade espermática pós sexagem significativos.

MANUFACTURERS

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. Corning, NY, USA.

⁸Microptic S.L. Barcelona, Spain.

⁹Nikon Instruments Inc. Tokyo, Japan.

¹⁰Dinâmica 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 propriedade 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. The authors report no conflicts of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper..

REFERENCES

- 1 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.

- 2 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.
- 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 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.
- 5 Carvalho J.O., Sartori R. & Dode M.A.N. 2014. Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. *Animal Reproduction*. 11: 199-206.
- 6 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.
- 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 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.
- 10 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.
- 11 Henkel R.R. & Schill W.B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 14: 1-108.
- 12 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.
- 13 Johnson L.A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: state of the art. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 93-107.
- 14 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.
- 15 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 Embrap-Cnpc*. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/43419/1/PROCIRM1996.00040.pdf>>
- 16 Matta C.G.F. 2003. *Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento*. 71f. Goytacazes, RJ. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- 17 Nunes J.F. & Salgueiro C.C.M. 2011. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research*. 98: 176-184.
- 18 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.