

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ESTÁGIOS

DETERMINAÇÃO DO SEXO DE BOVINOS

DIEGO XAVIER THEDY

PORTO ALEGRE

2010/02

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ESTÁGIOS

DETERMINAÇÃO DO SEXO DE BOVINOS

Autor: Diego Xavier Thedy

Orientador: Prof. Dr. João Batista Souza Borges

Monografia apresentada à Faculdade
de Veterinária como requisito parcial
para obtenção de Graduação em
Medicina Veterinária

PORTO ALEGRE

2010/02

LISTA DE SÍMBOLOS UNIDADES E ABREVIATURAS

MgCl₂	Cloreto de magnésio
X	Cromossomo X
Y	Cromossomo Y
XX	Cromossomos femininos
XY	Cromossomos masculinos
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DNA	<i>Deoxy ribonucleic acid</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
H	Horas
=	Igual
®	Marca registrada
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
n	Número
dNTP's	Oligonucleotídeos sintéticos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
%	Porcentagem
PIV	Produção <i>in vitro</i>
BRY4a	Sequencia específica-Y
B.C. 1.2	Sequencia específica-Y
SOF	<i>Sintetic oviduct fluid</i>
TE	Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES.....	7
2.1 Centrifugação em gradiente de densidade.....	7
2.2 CITOMETRIA DE FLUXO.....	8
2.3Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões.....	12
2.4 Semen sexado na FIV.....	13
2.5 Superovulação de doadoras inseminadas com sêmen sexado.....	16
3 SEXAGEM DE EMBRIÕES.....	18
3.1 Métodos não invasivos.....	18
3.2 Métodos invasivos.....	19
4 CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS.....	27

DETERMINAÇÃO DO SEXO DE BOVINOS

RESUMO: A determinação do sexo de bovinos tem sua utilização direcionada àqueles empreendimentos em que a sua produtividade depende de descendentes de determinado sexo. Dentre as formas de seleção do sexo da progênie, a sexagem de espermatozóide e de embriões são as técnicas comercialmente aplicáveis. A sexagem de espermatozoides ocorre através de citometria de fluxo. A sua utilização na IA é restrita às novilhas. Os danos causados a célula, pelo processo de separação e congelamento, são os principais fatores para diminuição da qualidade do sêmen sexado, prejudicando sua eficiência produtiva. A sexagem de embrião é uma ferramenta que pode contornar essa dificuldade de utilização do sêmen sexado. A sexagem embrionária acontece pela PCR. Existe a necessidade do aprimoramento das técnicas de sexagem tanto de espermatozóide quanto de embriões, para que seja possível sua larga utilização comercial.

Palavras-chaves: bovinos, sêmen sexado, transferência de embriões, citometria de fluxo, PCR.

SEX DETERMINATION IN CATTLE

ABSTRACT: Sex selection of offspring in beef and dairy herds can be an important issue to improve profits. Sexed semen or embryos are biotechnologies available to be used under field conditions. Sexed semen by cithometry can cause reduction in semen fertility and determined less productivity. Sex determination of bovine embryos by PCR would be an alternative to sexed semen. More research is necessary to improve efficiency of technology of sex sorted semen and embryos sex determination in order to extend the use in commercial application

Key words: cattle, sex-sorted sperm, embryo transfer, flow citometry, PCR.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução sofreu grandes avanços nas últimas décadas, permitindo um aumento da seleção de animais mais produtivos e possibilitando um salto genético nos rebanhos bovinos.

A determinação do sexo dos animais tem sido fonte de estudos para pesquisadores desde a década de 80. A utilização das técnicas de sexagem é destinada aos sistemas de produção no qual a rentabilidade do empreendimento depende de um maior número de reprodutores de um sexo.

Os progressos envolvidos com a técnica de seleção de espermatozóides baseada no conteúdo de DNA permitiram a utilização de sêmen sexado de forma comercial. No entanto, existe pontos que deveriam ser considerados na busca de resultados ainda mais eficientes, como aumentar a sensibilidade de seleção dos espermatozóides, diminuir danos funcionais causados aos mesmos, aumentando dessa maneira, a qualidade espermática e a capacidade de fertilização.

A sexagem de embriões tem envolvido técnicas desde a cariotipagem, até os protocolos envolvendo a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), a última, amplifica sequências específicas de DNA presentes somente no cromossomo Y. No entanto, apesar da alta acurácia, a maioria dos protocolos de PCR relacionados à seleção do sexo de embriões demanda o aumento do tempo, principalmente devido às etapas de amplificação e eletroforese. Buscam-se formas de diminuir o tempo envolvido nessas etapas com o uso de técnicas mais eficientes e com a utilização de protocolos sem a eletroforese.

Essas técnicas, contudo, possuem dificuldades quanto a sua aplicabilidade, devido aos custos e a praticidade da implantação relacionada com as mesmas.

Esse trabalho tem por objetivo revisar de algumas biotécnicas reprodutivas utilizadas na determinação do sexo de bovinos.

2 SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES

A sexagem espermática é uma técnica que pode ser utilizada tanto em humanos quanto em animais. Em humanos, sua aplicação visa minimizar as chances de ocorrência de doenças genéticas ligadas ao sexo. Já nos animais de produção, tem intuito de aumentar a rentabilidade de um empreendimento (SEIDEL, 1999). O controle do sexo em bovinos é de grande interesse comercial, pois é notório o porquê da seleção do sexo na produção de leite: a gestação e o nascimento de machos refletem na diminuição da produtividade e aumento dos custos de produção. Na produção de carne, as diferenças relativas às características de carcaça entre os sexos, são motivos para direcionar o sexo dos animais, pois o macho possui maior rendimento de carcaça ao abate em comparação às fêmeas na mesma idade de 24 meses. Outra razão para o controle de sexo dos animais de produção de carne é a formação de fêmeas de reposição, as quais serão utilizadas como matrizes, gerando produtos que possibilitam maior rendimento após o abate (HOHENBOKEN, 1999). Segundo Taylor 1999, na produção de animais puros, a máxima produtividade é alcançada quando toda a progênie é do sexo feminino, pois a conversão alimentar da matriz é inversamente proporcional ao número de bezerros gerados pela mesma.

O principal impulso para o aprimoramento da técnica de sexagem é o interesse comercial (GARNER, 2006). É necessário a busca de melhores resultados relativos com a seleção espermática, solucionando os problemas de fertilidade do sêmen sexado, melhorando a qualidade e viabilidade das células.

A quantidade de DNA contida no cromossomo X é, no caso dos bovinos, 4% maior do que no cromossomo Y. Embora pequena a diferença, é possível mensurar o conteúdo de DNA dos espermatozóides. A centrifugação em gradiente de densidade e a citometria de fluxo são duas técnicas descritas com base na separação pelo conteúdo de DNA dos gametas.

2.1 Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação ou sedimentação dos espermatozóides permite a separação das células contendo cromossomo X ou Y, porque existe uma diferença de massa relacionada com a quantidade de DNA e proteína nuclear, sendo maior nos portadores do cromossomo X. Alguns estudos citam as substâncias utilizadas como gradientes de alta densidade na separação dos espermatozóides. Blottner (1993) utilizou como gradiente solução de Percoll em concentrações variadas. Esse método possibilitou o fracionamento dos espermatozóides,

onde em sua maioria, os mais densos (X) ocuparam a parte inferior e os menos densos (Y) ocuparam a porção superior da fração. As frações foram posteriormente utilizadas para fertilização *in vitro* (FIV) e a sexagem dos embriões por PCR revelou 75% machos da fração superior e 92% de fêmeas da porção inferior.

2.2 Citômetro de fluxo

O conteúdo de DNA do espermatozóide é determinado através de um corante fluorescente, Hoechst 33342, que facilmente penetra na membrana da célula espermática e liga-se ao conteúdo de DNA. Os espermatozóides contendo cromossomo X coram-se 4% a mais do que aqueles contendo cromossomo Y. A exposição do corante a luz, com particular comprimento de onda, permite que um programa de computador analise esses 4% a mais de fluorescência, e consequentemente, maior quantidade de DNA. E dessa forma separa as células contendo cromossomo X ou Y. Para separação das células, a amostra é fracionada em gotículas por um sistema vibratório de cristais, formando cerca de 80000 gotículas por segundo. Um terço das gotículas contém espermatozóides, dois terços estão vazias e poucas gotículas contém dois ou mais espermatozóides. A gotícula analisada pelo computador recebe uma carga positiva caso o espermatozóide contenha cromossomo X, caso a gotícula contenha o cromossomo Y, uma carga negativa é adicionada, nenhuma carga é adicionada à gotícula nos casos onde haja mais de um espermatozóide, nenhum espermatozóide ou espermatozóides danificados. Assim que as gotículas deixam o orifício do citômetro, passam através de campos elétricos que possui um lado positivo e outro negativo. Ocorre a atração das cargas opostas: a gotícula positiva (cromossomo X) direciona-se ao campo negativo, enquanto que a gotícula negativa (cromossomo Y) desloca-se para campo elétrico positivo. Na prática, 40% dos espermatozóides são separados (20% contendo Y e 20% contendo X), os outros 60% acabam não sendo selecionados devido aos danos causados e pelas gotículas contendo mais de um espermatozóide (SEIDEL, 2007).

A concentração da dose utilizada na inseminação de bovinos é de 20×10^6 . Inicialmente, a seleção dos espermatozóides por citometria de fluxo possuía uma grande limitação, pois era capaz de separar apenas 400.000 espermatozoides/h. Neste caso, levaria 25 h para formação de uma dose na concentração de 10×10^6 para cada sexo (GARNER, 2008). Como somente as células que percorrem o fluxo alinhadas ao laser e ao detector podem ser mensuradas, desenvolveu-se um sistema de orientação de agulha que posiciona as células corretamente, isso possibilitou a produção de mais de 11×10^6 de espermatozóides/h

(BATISTA, 2008). Outros resultados encontrados na literatura revelam uma produção de 14 a 18 milhões espermatozoides/h (REMILLARD, 2007). Esses resultados são decepcionantes quando se considera que uma dose convencional possui 20×10^6 espermatozoides, o que significa que se produzirá uma dose por hora na mesma concentração de sêmen sexado.

Sob boas condições de manejo, incluindo nutrição, controle de enfermidades, detecção de estros, manuseio do sêmen e técnica de inseminação, a fertilidade de novilhas geralmente é maior do que de vacas lactantes, em estudo utilizando novilhas, a taxa de prenhez com dose 2 milhões espermatozoides sexado foi de 56%, enquanto o grupo controle com sêmen convencional e concentração de 10×10^6 teve 61% de prenhez (SCHENK, 2005).

Desta forma, para tornar-se viável na inseminação artificial, utiliza-se comercialmente, uma baixa concentração na dose, normalmente 2×10^6 espermatozoides.

Seidel et al. 1999, em experimento utilizou 1370 novilhas, um grupo bastante heterogêneo, sob diferentes tratamentos de sincronização de estros, raça, manejo e propriedades. 1000 novilhas foram inseminadas com sêmen sexado e 370 com sêmen convencional. As doses comparadas tinham concentrações de $1,0-1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 para sêmen sexado, enquanto o controle convencional possuía 20 e 40×10^6 espermatozoides. Os resultados das taxas de prenhez para grupo sexado foram, de um modo geral, 70-90% das taxas do grupo controle. Houve pouca diferença entre as doses $1-1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 do sêmen sexado, porém, não sendo justificativa para aumento da dose dependendo do touro utilizado. O autor também relaciona o local de deposição do sêmen, e que pode haver uma diferença na taxa de prenhez caso seja realizada por profissional treinado, do lado ipsilateral ao folículo ovulatório. As perdas gestacionais entre os 30-60 dias de gestação foram similares entre os grupos, sexado (8,8%) e convencional (6,2%).

Kurikyn (2007) comparou o efeito na taxa de prenhez de 209 novilhas, dependendo do local uterino de deposição do sêmen sexado congelado, em inseminação artificial a tempo fixo. O tratamento baseou-se em duas aplicações de luteolítico com intervalo de 14 dias e a inseminação realizada 80-82 horas após a segunda aplicação. A dose de sêmen possuía concentração de $2,2 \times 10^6$ espermatozoides e a deposição realizada no corpo do útero (UB) ou intra-cornual, no meio do corno (MH) ou próximo a junção útero-tubárica (UTJ). A taxa de prenhes total foi de 43%, e não diferiu significativamente entre os grupos, entre as propriedades onde as novilhas eram criadas, nem entre os dois touros que produziram o sêmen. As taxas de prenhez foram: 41,9% para grupo UB, 49,1 para grupo MH e 39,3% para grupo UTJ. Houve diferença entre o grupo de animais que tiveram forte ou fraca demonstração de estro, 45,9% e 20,8%, respectivamente.

Seidel 2008 relata que não houve diferença na taxa de prenhes de novilhas angus quanto ao local de deposição do sêmen sexado (corpo ou cornos uterinos). Quanto a concentração também não houve diferença entre $1,5$ e 6×10^6 espermatozóiide por dose. Sendo que a taxa de prenhez foi 75% do grupo controle onde se utilizou sêmen convencional. Em mesmo estudo, notou uma queda na taxa de prenhez quando se utilizou a dose $1,0 \times 10^6$ espermatozóiides em comparação com doses mais elevadas, a menor fertilidade do sêmen sexado não é compensada pelo aumento do número de espermatozóiides no intervalo de $1,5$ a 6×10^6 por dose.

Chebel et al (2010) realizaram experimento com objetivo de avaliar o efeito do uso de sêmen sexado na primeira inseminação de novilhas, sobre a saúde e produtividade durante a primeira lactação. As novilhas inseminadas com sêmen sexado (grupo SX) e convencional (grupo CS) obtiveram 40,2% e 51,8% de taxas de prenhez, respectivamente. A taxa de nascimento de fêmeas para os dois grupos foi 85,7% para grupo SX e 47,7% para o grupo CS, o grupo SX teve maior taxa de natimortos, 8,8% contra 3,4% do grupo CS. Os custos com a criação das novilhas, da primeira IA até a parição, foram maiores para novilhas inseminadas com sêmen sexado, porém, o rendimento econômico com terneiro parido foi maior no mesmo grupo. Os custos com a terneira nascida foi menor no grupo SX. O tratamento não afetou a proporção de dificuldades durante o parto, refletida na necessidade de assistência ao parto, ocorrência de retenção de placenta ou metrites. O rendimento de leite e custos com alimentação não diferiram entre os grupos. O retorno econômico total foi maior para o grupo de novilhas inseminadas com sêmen sexado. Assim sendo, o uso de sêmen sexado para primeira inseminação de novilhas reduz os custos por fêmeas produzidas e aumenta o retorno econômico durante a lactação.

Underwood et al 2009, avaliou a fertilidade in vivo de sêmen congelado posteriormente sexado e congelado novamente (FSF) comparando com sêmen resfriado, sexado posteriormente congelado (CSF), visto que a distancia entre os reprodutores e o local de processamento do sêmen é um limitante para utilização da técnica. Novilhas foram inseminadas com sêmen convencional, FSF e CSF, obtiveram-se as seguintes taxas de prenhez: 57,4%, 4,1% e 7,3% respectivamente. Houve diferença entre os touros utilizados, touro 1: convencional, 63%; FSF 8,6% e CSF 10%; touro 2: convencional, 45,5%; FSF 0% e CSF 4,8%. A perda gestacional para sêmen sexado foi de 83,3%, apenas uma novilha do grupo CSF pariu uma fêmea. O grupo não sexado teve 8,3 % de perda gestacional. O autor relaciona a baixa fertilidade e alta taxa de perda gestacional do grupo sexado com a função espermática afetada pelo processo de separação e recongelamento dos espermatozóiides.

Sabe-se que a fertilidade do sêmen sexado é menor quando comparada ao sêmen convencional. Questiona-se a causa da queda na fertilidade, que poderia ser pela menor concentração da dose ou pelo processo de citometria. Frijster 2009 avaliou o efeito da baixa dose de espermatozoides de sêmen sexado e não sexado. Além disso, o efeito do touro. As concentrações do sêmen convencional eram 15×10^6 e $2,0 \times 10^6$ e para o sêmen sexado 2×10^6 espermatozoide por dose. Os resultados indicaram um declínio da fertilidade do sêmen sexado. Quando se avaliou o efeito da baixa concentração e o processo de sexagem separadamente, estimou-se que dois terços da diminuição da fertilidade foi causada pela baixa concentração e um terço causada pela sexagem. O efeito da baixa concentração e da sexagem diferiu entre os touros, implicando que a fertilidade do touro usado para seleção do sexo não pode ser predita apenas pelas provas de campo com sêmen convencional. O monitoramento dos resultados com sêmen sexado e a manutenção do touro com alta fertilidade é o melhor método para melhorar a fertilidade do sêmen sexado.

Mesmo que o touro produza um ejaculado de boa qualidade, não necessariamente, após a separação, o sêmen manterá essa qualidade. A coloração do espermatozoide acaba afetando sua capacidade de fertilização. Alguns touros necessitam uma concentração superior de corante para obter uma boa diferenciação entre as células masculinas e femininas, porém, uma quantidade excessiva diminui a viabilidade dos espermatozoides (REMILLAR, 2007). Jonhson 2000 relata que os espermatozoides sexados pelo citômetro sofrem capacitação prematura, afetando o congelamento dos mesmos, porém, não prejudica a realização de FIV logo após a separação, dispensando a capacitação espermática. A criopreservação do sêmen sexado tem metodologia igual a do sêmen convencional e possibilita sua comercialização, porém, a qualidade e viabilidade dos espermatozoides são diminuídas após o processo (HOLLINSHEAD, 2002).

Após a descongelação, a proporção de espermatozoides móveis, com membrana íntegra e vivos com acrossoma íntegro é menor para o sêmen sexado quando comparado ao não sexado. O processo de sexagem aumenta a sensibilidade dos espermatozoides a futuros danos, como a congelação (NETO 2009). Mocé et al 2006 demonstraram, comparando o sêmen sexado fresco e criopreservado, que o processo de congelação e não a sexagem gera danos a membrana das células.

Pela metodologia utilizada no processo de sexagem considerou-se a possibilidade de alterações no conteúdo genético das células. As amostras usadas para sexagem são manuseadas sob ambiente para-biológico, tal como a interação do DNA com fluorescência, exposição ao laser, separação dos espermatozoides em gotículas, aceleração através canais de

fluido sob pressão e centrifugação. Esses meios ou interações mecânicas poderiam produzir mudanças na estrutura celular, incluindo a molécula de DNA. A fim de avaliar a fragmentação do DNA do espermatozóide após o processo de seleção, Gonsálves (2010) avaliou as alterações antes e depois da seleção. Os espermatozoides foram ordenados quanto ao sexo (X e Y) e inviáveis. A fragmentação do DNA pré-separação foi significativamente maior que o encontrado na população sexada. O autor explica que há uma tendência dos espermatozoides com fragmentação do DNA acumularem-se na população de células inviáveis.

Alguns pesquisadores demonstraram que não houve diferença dos animais nascidos originados de sêmen sexado e convencional nem aumento da taxa de aborto. Alguns indicadores como tempo de gestação, peso ao nascer, natimortos e ganho de peso também não apresentaram diferença entre as populações (TUBMAN 2003).

2.3 Produção *in vitro* (PIV) de embriões

Na década de 70 começaram a ser divulgados os primeiros relatos sobre *maturação in vitro* (MIV) e *fecundação in vitro* (FIV) na espécie bovina, porém, somente em 1980 fora constatado o primeiro nascimento de um terneiro oriundo da técnica (BRACKETT, 1982). No Brasil, a PIV possui grande valor comercial devido à boa resposta de bovinos da raça zebuína na obtenção e produção de embriões pela FIV. A PIV, apesar do menor desempenho, também tem sido utilizada nas raças produtoras de leite, permitindo um maior aproveitamento do sêmen sexado, com a utilização de doses poucos concentradas na produção de embriões, selecionando os descendentes com sexo pré determinado.

A PIV compreende a maturação *in vitro* de ovócitos, a fecundação *in vitro* e o cultivo embrionário (CIV) *in vitro*, e inicia-se pela recuperação do ovócito do interior do folículo. Após a recuperação e seleção, os ovócitos são submetidos a MIV, preparando-o para fecundação. A maturação oocitária envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas que devem ocorrer nos oócitos, tornando-os fecundáveis, tais como o rompimento do envoltório nuclear com condensação dos cromossomos, a reprogramação na síntese protéica e a expansão das células do *cumulus* que circundam os oócitos (DODE 2002).

In vivo, o ovócito sofre modificações bioquímicas e metabólicas desde o estágio de prófase I até o de ovócito maduro para fecundação. As gonadotrofinas participam ativamente no desenvolvimento e maturação dos ovócitos. Os meios de maturação são baseados no emprego de gonadotrofinas bovinas e de outras espécies. Os oócitos são cultivados por um

período de 22-24 horas, inúmeros meios podem ser utilizados nessa etapa, porém, os mais comuns são os meios de cultura de células, como TCM-199®, composto por sais de Earle's (PALMA, 2001). Este meio pode ser modificado, com uso de fontes de suplementação energética. Fatores como pH, osmolaridade, composição iônica, temperatura da estufa e tensão de CO₂ e O₂ são importantes para que a maturação ocorra com sucesso (NAGAI, 2001).

A fertilização *in vitro* depende da qualidade dos ovócitos e espermatozoides utilizados. Portanto, após a maturação, os ovócitos são expostos aos espermatozoides para que ocorra a fecundação. Como ocorre em condições fisiológicas, as células espermáticas devem alcançar sua capacidade fecundante, através de um processo de preparação *in vitro* com intuito de iniciar sua capacitação e desencadear a reação acrossômica. A heparina tem importante papel fisiológico na capacitação espermática e é usada durante esse processo *in vitro*, desencadeando a capacitação que finaliza na reação acrossômica, permitindo a penetração do espermatozoide na zona pelúcida (PALMA, 2001). As técnicas de seleção e preparação dos espermatozoides (swin up e gradiente de Percoll) têm o objetivo de separar os espermatozoides do líquido seminal e do diluente, assim como obter espermatozoides com um mínimo de 70% de motilidade progressiva. Os ovócitos e espermatozoides são incubados em meio específico, por um período de aproximadamente 18 horas, à temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES, 2001). Após a fecundação, os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecem até atingirem o estágio de blastocisto. As condições de cultivo podem influenciar a qualidade dos embriões e envolvem fatores como meio, atmosfera gasosa, densidade, presença ou não de co-cultivo e tipo de suplementação protéica. O meio simples como fluido de oviduto sintético (SOF) pode ser substituído pelo co-cultivo em meio acrescido de células somáticas (GONÇALVES, 2008).

2.4 Sêmen sexado para FIV

Existem muitos trabalhos avaliando a utilização de sêmen sexado e produção *in vitro* de embriões. O principal atrativo para o uso do sêmen sexado é a necessidade de poucos espermatozoides para realizar a fertilização. Muitos fatores influenciam no sucesso na PIV de embriões quando usa o sêmen sexado. Esses fatores podem incluir menores taxas de fertilização, menores taxas de clivagem, menores taxas de formação de blastocistos, menores

taxas de prenhez, capacitação parcial do esperma, diluição espermática e variações entre os reprodutores (MHEELER, 2006).

Os primeiros relatos do uso de sêmen sexado X e Y por citometria de fluxo na FIV foram realizados por Cran, 1993 e Welsh, 1994. Onde separam uma quantidade de 200 espermatozoides por ovócito. Os embriões produzidos foram sexados por PCR que resultou em 73% de acerto para o sexo X e 68% para Y. Houve uma produção de 18 embriões, nove transferências e 44% de prenhez.

Cran 1994 relatou um acerto de 90% na separação dos espermatozoides bovinos X e Y confirmada depois da FIV e transferência dos embriões (TE). A taxa de clivagem variou de 79% e 80% depois da fertilização (para espermatozoide X e Y, respectivamente). Porém, houve uma menor taxa de desenvolvimento de blastocisto (17%) em comparação ao grupo convencional (36%).

Em experimento com uso do sêmen sexado na PIV de embriões e subsequente transferência para receptoras novilhas e vacas da raça holandesa, Wilson 2006 avaliou a taxa de desenvolvimento de blastocisto, número e qualidade de embriões. Para isso, realizou ovariectomia de vacas para recuperação dos ovócitos e utilizou sêmen sexado comercial. O grupo controle era composto por ovócitos fertilizados com sêmen convencional. A taxa de desenvolvimento dos blastocistos fertilizados com sêmen convencional foi significativamente maior em relação aos embriões oriundos de sêmen sexado, 20,1% vs. 12,2%. A taxa de concepção dos embriões transferidos às receptoras foi de 34,2% para novilhas e 18,2% para vacas em lactação. As doadoras que produziram mais ovócitos ou mostraram maior taxa de clivagem, produziram mais embriões transferíveis e blastocistos. Como a taxa de clivagem foi similar para FIV com sêmen sexado e convencional, o processo de sexagem aparentemente, não impediu o espermatozoide de fertilizar o ovócito. Porém, a sexagem diminuiu a capacidade do embrião desenvolver normalmente.

Apesar da eficácia do sêmen sexado na FIV, a proporção de ovócitos fertilizados que desenvolvem blastocistos é menor quando comparada com sêmen não sexado, indicando que alguns fatores podem afetar os resultados (LU, 1999). Zhang 2003 utilizou sêmen sexado e sêmen convencional corado ou não corado com objetivo de avaliar essa etapa do processo de separação espermática. Diferentemente de outros estudos, não houve diferença significativa na taxa de desenvolvimento de blastocistos por ovócito para os três tratamentos. Porém, a taxa de clivagem para com sêmen sexado e corado não sexado foi menor em comparação ao controle. O sêmen de diferentes touros poderá influenciar na taxa de clivagem e desenvolvimento dos embriões, apesar do experimento ter demonstrado uma menor taxa de

clivagem para um dos touros, não houve interações significativas entre os touros para os fatores avaliados. Essa diferença entre os touros é refletida nas variações do processo de capacitação e, conseqüentemente, na fertilização dos ovócitos e desenvolvimento ao estágio de blastocisto. Portanto, com uma seleção apropriada dos touros, o sêmen sexado é eficaz na FIV de embriões bovinos.

Xu 2006 demonstrou uma variação na taxa de desenvolvimento de blastocistos fertilizados com sêmen sexado, sendo essa diferença atribuída aos reprodutores. Os embriões produzidos foram congelados por vitrificação, e após descongelamento apresentaram alta qualidade morfológica (96%) e taxa de eclosão (84,4%), resultados condizentes com aqueles produzidos com sêmen convencional (93,1% e 80,6%, respectivamente). A taxa de prenhez foi de 40,9%, esse resultado não diferiu com as taxas relacionadas com FIV com sêmen convencional (41,8%) ou produção in vivo de embriões (53,1%). Dessa maneira, é possível utilizar a vitrificação como método de congelamento de embriões produzidos por FIV com sêmen sexado, permitindo a formação de um banco genético de fêmeas leiteiras, disponibilizando uma geração de novilhas de reposição para produção leiteira.

Semelhante à IA com sêmen sexado, a transferência de embriões produzidos por FIV com sêmen sexado, é maior em novilhas do que em vacas. Wilson 2005 demonstrou 34,2% de taxa de prenhez em novilhas com detecção de estro, enquanto em vacas a taxa foi 16,3% em vacas com detecção de estro, e 20% para àquelas sincronizadas com protocolo Ovsynch. O autor sugere que a FIV usando vacas de descarte como doadoras, em conjunto com sêmen sexado pode ser uma efetiva ferramenta visando o aumento da eficiência produtiva de um rebanho leiteiro.

Embora seja viável a utilização do sêmen sexado para PIV de embriões, ainda há muitos pontos a serem melhorados na busca de uma melhor eficiência na técnica. Esses pontos estão associados a cada passo do processo, desde a separação dos espermatozóides, maturação do ovócito, fertilização, meios e criopreservação. Relacionado à fertilização e variação entre touros, a heparina pode aumentar ou diminuir a eficiência de capacitação. Quando a concentração dessa substância e de sêmen é adequada para diferentes touros, a produção de blastocisto pode ser similar entre o sêmen convencional e sexado. Outro procedimento que visa melhor eficiência de fertilização é a injeção intracitoplasmática de espermatozóide, porque utiliza um espermatozóide para fertilizar um ovócito. Os meios de cultura influenciam sobre os resultados da PIV. Como há predominância do sexo dos espermatozóides, os meios de cultura são diferentes para PIV quando utiliza-se sêmen sexado ou convencional. O crescimento dos embriões machos e fêmeas é diferente, indicando uma

diferença metabólica que requer nutrientes específicos para cada sexo. A melhora da eficiência de cada passo da PIV com sêmen sexado pode aumentar a produção e qualidade de embriões, refletindo em melhores taxas de prenhez e parição referente à técnica (JU, 2009).

2.5 Superovulação de doadoras inseminadas com sêmen sexado

Desde o início da técnica de sexagem espermática, relacionou-se a sua utilização em programas de superovulação e transferência de embriões, com intuito de maximizar a dose seminal. Há relatos do uso de doses sexadas mais concentradas que o sêmen sexado comercial em experimentos. Panarace 2003 concentrou a dose sexada em 10×10^6 e realizou três inseminações, obtendo bons resultados na produção de embriões viáveis de vacas e novilhas superovuladas. Sartori 2004 com a concentração de 10×10^6 de sêmen sexado e duas inseminações, demonstrou não haver diferença significativa na taxa de transferência de embriões comparada com uma dose de sêmen convencional, porém, as taxas foram menores.

Hayakawa 2009 et. al. realizaram programas de superovulação e transferência de embriões com semen sexado em vacas de leite. O objetivo foi comparar a resposta de novilhas e vacas inseminadas com semen sexado congelado, sexado fresco e congelado convencional. No experimento 1, utilizaram 10 novilhas divididas em dois grupos, para os quais utilizaram-se sêmen congelado, um sexado e outro convencional de um mesmo touro, ambos com dose de 5×10^6 . Foram realizadas duas inseminações por doadora 12 e 24 horas após detecção de estro. O grupo sexado apresentou de um modo geral, resultados inferiores ao grupo convencional, com menor taxa de embriões transferíveis, maior taxa de não fecundados, e significativamente houve menor produção de embriões com grau de qualidade 1. Num segundo experimento utilizando sêmen sexado congelado ou fresco, com concentração de 5×10^6 não houve diferença significativa na taxa de produção de embriões, porém, novamente demonstrou-se um queda na porcentagem de embriões de grau 1 para os dois grupos sexados em comparação com grupo controle, o qual utilizou sêmen convencional. Comparando duas inseminações com sêmen sexado em novilhas ou vacas superovuladas, a porcentagem de embriões viáveis foi maior no grupo de novilhas. A produção de embriões viáveis pode ter sido relacionado à maior concentração da dose em comparação ao sêmen sexado comercial. A eficiência de um programa de TE deve estar relacionado aos custos da execução da técnica, o sêmen sexado, sem dúvida gera maiores gastos com a sua aquisição, ainda mais se os resultados obtidos forem insatisfatórios.

Larson 2010 demonstrou resultados similares ao encontrado por Hayakawa 2009, quando utilizou quatro inseminações com sêmen sexado comercial. As vacas, de ambos os grupos, foram inseminadas uma vez durante o estro, duas vezes 12hs após a detecção de estro e uma vez 24 horas após a detecção de estro. A hipótese de que com o aumento de número de inseminações poderia demonstrar um aumento na produção de embriões viáveis coletados de vacas superovuladas inseminadas com sêmen convencional. No entanto, houve maior produção de embriões de grau de qualidade 1 para o grupo sêmen convencional, assim como u numero de não-fecundados. As taxas de embriões grau 2 e 3, e embriões degenerados não diferiu entre os grupos. Os resultados demonstram que é possível obter embriões com sexo pré -determinado de vacas superovuladas, porém, a taxa de fertilização acaba sendo comprometida aproximadamente em 20%.

Os resultados indicam a possibilidade da produção de embriões viáveis pela superovulação de vacas doadoras, porém, deve ser tomado em consideração os custos relacionados com o programa, e principalmente os custos com sêmen sexado.

O sêmen sexado alavancou um progresso na determinação do sexo em bovinos, no entanto a sua utilização comercial é limitada ao uso em novilhas. Fatores como a baixa concentração por dose e qualidade espermática diminuída explicam a diminuição na fertilidade quando se usa o sêmen sexado.

3 SEXAGEM DE EMBRIÕES

A determinação do sexo de embriões, antes da transferência, tem sido o desejo de muitos produtores desde a utilização comercial da transferência de embriões na década de 70 (THIBIER, 1995).

Alguns métodos foram descritos para determinação do sexo de embriões. Eles podem ser classificados como invasivos ou não invasivos, de acordo com a realização de biópsia para obtenção de células embrionárias. Os métodos mais precisos são os invasivos e incluem a visualização dos cromossomos sexuais pela análise citogenética ou pela determinação de uma sequência de DNA específica do cromossomo Y, após sua amplificação por biologia molecular. As técnicas não invasivas baseiam-se na detecção sorológica do antígeno de histocompatibilidade H-Y, responsável pela organogênese testicular e pela atividade enzimática ligado ao cromossomo X.

3.1 Métodos não invasivos

É possível se detectar o antígeno H-Y na membrana celular de mamíferos do sexo masculino através de provas sorológicas (Wachtel, 1984), pois apenas os machos expressam o antígeno de histocompatibilidade Y (antígeno H-Y) na superfície da membrana celular.

O método pela citotoxicidade baseia-se no cultivo de embriões em meio quimicamente definido, contendo anticorpos anti H-Y em diluições que variam de acordo com a atividade dos anticorpos. Com a união do anticorpo anti H-Y ao antígeno H-Y (embriões machos), ocorre a lise celular e considerados como embriões machos e aqueles que continuam desenvolvimento fêmeas. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez em murinos por Kcero e Goldberg, 1996.

A imunofluorescência indireta detecta o antígeno H-Y das células somáticas, e foi adaptada para identificar o sexo de embriões. Esse método do permite a sobrevivência dos embriões que expressam o antígeno H-Y (machos). Essa técnica envolve inicialmente a exposição dos embriões ao anticorpo primário (anti H-Y), em seguida os embriões são transferidos aos meios de cultivo contendo anti-imunoglobulina marcado com isotiocianato de fluoresceína. Os embriões são analisados quanto a presença ou ausência de fluoresceína, é possível determinar o sexo de embriões bovinos com 85% de exatidão com essa técnica. (VAN VLIET, 1989)

Durante o desenvolvimento embrionário há um período em que ambos os cromossomos do sexo feminino são transcritos. As enzimas codificadas por genes localizadas nesses cromossomos têm suas atividades e concentrações aumentadas. Através da avaliação da atividade enzimática é possível determinar o sexo de embriões. A utilização desse método está restringido ao período de atividade dos cromossomos X. Na espécie bovina a ativação do genoma ocorre no estágio de 8 a 16 células e sua inativação ainda não está bem definida, porém, considera-se o momento em que começa o estágio de blastocisto. A quantidade de enzima é detectada pela adição de uma co-enzima e um corante ao meio de cultivo. A intensidade de coloração classifica os embriões quanto ao sexo, sendo que a fêmea terá maior intensidade (MONK, 1988).

3.2 Métodos invasivos

A micromanipulação embrionária é um procedimento que se refere à manipulação das células do embrião. Com a obtenção de biopsia é possível determinar o sexo e possibilitar seu desenvolvimento.

Os primeiros estudos na década de 80 demonstravam a retirada de 8-10 células da massa embrionária, porém, atualmente sabe-se que uma quantidade menor de células (4-5 células) possibilita o processo de sexagem. As formas de realizar a biópsia podem ser por microsecção, quando se emprega uma lâmina para proceder ao corte, ou por microaspiração, quando se utiliza uma pipeta de vidro para aspirar algumas células do embrião (THIBIER, 1995).

Segundo alguns pesquisadores, pode haver diferença na viabilidade dos embriões quando se utiliza uma ou outra técnica para realizar a biopsia. Carbonneau (1997) avaliou embriões produzidos *in vitro* microaspirados ou microseccionados, nos dias cinco e sete de desenvolvimento, respectivamente. O procedimento de microsecção realizado no dia sete possibilitou uma maior taxa de desenvolvimento dos embriões e um aumento na taxa de prenhez em comparação com a microaspiração dos blastômeros realizada aos cinco dias (70% vs. 55%). Embriões no sétimo dia de desenvolvimento possuem maior resistência ao estresse causado pela manipulação.

Thieber (1995), comparando os dois métodos de realização da biopsia demonstrou maior eficiência à técnica de microaspiração, as taxas de prenhez foram 55% e 28% para microaspiração e microsecção, respectivamente.

Cardoso e Butzke (2010) avaliaram as taxas de prenhez entre as transferências de embriões intactos (n=3240) e biopsiados por microsecção (n=901), de acordo com estágio de desenvolvimento e grau de qualidade. Os índices de prenhez não demonstraram diferença significativa entre embriões intactos ou biopsiados de grau de qualidade 1 e 2 nos estágios de mórula e blastocisto. Embriões em estágio de mórula com grau de qualidade 3 apresentaram menores taxas de prenhez quando biopsiados em comparação a embriões intactos. Esse trabalho, realizado a campo com embriões produzidos *in vivo*, comprova que a sexagem de embriões por microsecção não afeta a taxa de prenhez quando realizada em embriões de grau de qualidade 1 e 2, independente do estágio de desenvolvimento.

A análise citogenética é um método invasivo de determinação do sexo de embriões. Gardner e Edwards (1968) relataram a sexagem de embriões de ratos pela coloração celular com aceto-orceina e posterior visualização do Corpúsculo de Barr. Porém, a presença do Corpúsculo (formado pelo cromossomo X inativo) não é indicador confiável do sexo das células nos animais domésticos. A partir d biopsia também é possível determinar o sexo de embriões através do cariótipo. As biópsias incubadas em meio miostático (colchicina), que sincroniza as células em metáfase, possibilitando a identificação do par de cromossomos sexuais XX e XY. A desvantagem desse método é devido a dificuldade de obter biopsias que detenham a fase desejada. Essa limitação pode ser contornada pela utilização de células removidas de embriões de 12 a 15 dias de desenvolvimento. Betterige (1981) relatou 60% a 60% de embriões sexados corretamente através dessa metodologia. Contudo, embriões na idade referida não podem ser transferidos ou congelados. A sexagem por citogenética é de difícil aplicação, pois a análise necessita de condições controladas de manipulação dos embriões e pelo o tempo exigido ser muito grande.

A sexagem de embriões que envolvem a técnica de biologia molecular baseia-se na detecção de sequencias específicas de DNA. O conhecimento de regiões específicas do cromossomo Y possibilitou a identificação do sexo. Os métodos empregados primeiramente foram a hibridização *in situ* e *dot blot*. Essas técnicas foram utilizadas ate o desenvolvimento da *Polimerase Chain Reaction* (PCR).

A PCR é fundamentada na amplificação do DNA *in vitro* pela utilização de enzimas termorresistentes como a Taq Polimerase. A região a ser amplificada é flanqueada por *primers* (iniciadores), que realizarão a replicação da região do DNA buscada. Essas regiões facilitam a operação quando se tratam de sequências únicas ou com pouco número de cópias e também sequencias com elevado número de cópias repetidas. Existem sequencias altamente específicas do cromossomo Y, porém, seu baixo número de cópias dentro do genoma acaba

prejudicando seu uso na determinação do sexo de embriões. Várias sequências do cromossomo Y possuem elevados números de cópias e são aplicáveis na determinação do sexo de animais e humanos (PALMA, 2001) Segundo Bondioli (1992) foram descritas sequências específicas do cromossomo Y no bovino, a sequência BRY4a, repetida aproximadamente 500 vezes; B.C. 1.2 com 49 pares de base e 2000 repetições; e três sequências sem funções específicas repetidas de 20 a 2600 vezes no genoma.

A amplificação do DNA consiste de vários ciclos com três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. O primeiro ciclo ocorre a temperatura entre 90-95°C, permitindo a abertura da dupla fita de DNA, pela quebra das ligações entre os nucleotídeos. O segundo ciclo ocorre o anelamento dos iniciadores à temperatura entre 50-60°C, possibilita a amplificação da sequência de DNA desejada, a extensão do segmento a partir dos iniciadores, correspondente ao terceiro ciclo e ocorre a temperatura de 72 °C pela ação da enzima termorresistente. Os ciclos de temperatura para realização da PCR são repetidos várias vezes e a amplificação do DNA ocorre de forma geométrica. Inicialmente, o controle da temperatura era realizado em três banhos-maria, já que a mudança de temperatura deve ocorrer rapidamente. Atualmente, utilizam-se termocicladores que contribuem para aperfeiçoar a técnica (REGITANO, 2001).

Inicialmente, em experimentos de sexagem de embriões, a amplificação era realizada por apenas um par de *primers* apenas referente à sequência do cromossomo Y . As amostras que não revelassem amplificação eram consideradas fêmeas, o que pode acarretar falhas no diagnóstico, pois a não amplificação na verdade revela a falta de DNA na amostra. Considerando essa possibilidade, houve uma inclusão de *primers* referentes a regiões autossômicas dos bovinos. Desta maneira, a formação de duas bandas no gel de agarose é interpretada como embrião macho, quando não há formação da banda referente às regiões macho-específicas e apenas formação da banda autossômica, esse resultado é relativo a uma fêmea (LOPES, 2001).

Durante a década de 90 estudos realizados na França demonstraram a aplicabilidade da determinação do sexo de embriões pela utilização da PCR. Com as condições encontradas nas propriedades, a tecnologia molecular tem se mostrado altamente sensível (permite biopsias de poucas células), eficiente com 95% de separação e precisa, com 98% do sexo selecionado corretamente (THIBIER, 1995).

A PCR é uma técnica extremamente sensível e demanda cuidados específicos, normalmente inexistentes em laboratórios de campo, o que pode resultar na degradação dos reagentes. É necessária uma adaptação das condições de apresentação, acondicionamento até

o local de utilização e armazenamento. Os reagentes devem permitir a extração do DNA pela lise celular, para isso utiliza-se soluções basicamente com $MgCl_2$ e proteína *quinase*. Essa solução contendo a biopsia é incubada a temperatura de $55^\circ C$ por alguns minutos e após eleva-se a temperatura a $95^\circ C$ para inativação da proteína *quinase*. Outra solução deve permitir a amplificação do DNA sendo constituída de *Taq polimerase*, dNTP's, e *primers* específico-Y e autossômico. É importante a utilização de amostras controles para validação da amplificação, compostos células machos, fêmeas e controle negativo, pois avalia a contaminação, presença da amostra nos tubos e correto funcionamento da solução de amplificação. O produto da amplificação é submetido à eletroforese em gel de agarose. O brometo de etídio contido no gel e se visualiza sobre luz ultravioleta. (SOUZA, 2007).

Uma grande limitação da PCR na determinação de embriões a campo é tempo compreendido entre a biopsia e a transferência, pois a viabilidade dos embriões pode ser afetada durante a longa permanência *in vitro*. Nesse contexto, pode-se realizar a transferência dos embriões, enquanto ocorre o procedimento da PCR. Após o resultado, é possível interromper a gestação das receptoras nas quais foram inovuladas embriões do sexo indesejado, pela administração de luteolítico (THIEBER, 1995). Souza (2007) comparou a viabilidade de embriões intactos e biopsiados mantidos *in vitro* do período desde a coleta até a transferência às receptoras. Os índices de gestação, entre os grupos intacto e biopsiado, foram 54,2% e 55,8% respectivamente. Esses resultados demonstram que a micromanipulação para identificação do sexo de embriões e a manutenção dos mesmos *in vitro* até a transferência não interferem na viabilidade dos embriões, o que permite uma melhor eficiência da técnica pelo melhor aproveitamento das receptoras nos programa de TE realizados a campo.

É possível eliminar a etapa de eletroforese, simplificando o protocolo de PCR para determinação do sexo de embriões a campo, diminuindo o tempo consumido e necessidade de aparelhagem. A visualização do sexo é feita diretamente das amostras amplificadas nos tubos usando luz ultravioleta (BREDBACKA, 1995).

O tempo tomado na realização da PCR na FIV não afeta a técnica, pois a biopsia pode ser feita com antecedência no estágio embrionário de 16-32 células. Luz et al (2000) comprovaram que embriões produzidos *in vitro* podem ter o sexo determinado com acurácia de 100% pela técnica de PCR, quando se utiliza *primers* específicos e autossômicos. Os fragmentos amplificados no experimento possuíam tamanhos muito próximos, apenas 20 pares de base de diferença. O gel de poliacrilamida 8% mostrou-se eficiente na separação dos fragmentos. Os embriões analisados pela técnica de PCR demonstraram uma taxa de prenhez de 61,5%, o que não diferiu estatisticamente dos 67,5% de prenhez do grupo controle não-

micromanipulado. Em experimento similar, Park et al. 2001 demonstraram a possibilidade de identificar o sexo de embriões FIV de 8-16 células pela remoção de um, dois, quatro ou oito blastômeros. A eficiência de sexagem da PCR foi de 92; 94,3; 96,3 e 100% respectivamente.

Dentro do contexto de metodologias eficientes, necessita-se reduzir o tempo atribuído a realização da técnica da PCR, principalmente no que se refere a uma utilização comercial da técnica, porém, é importante manter a simplicidade e precisão do método.

Um método rápido foi descrito por Hirayama et al. 2004, e emprega a amplificação isotérmica de DNA. Para isso utilizam-se quatro *primers* que reconhecem seis sequências específicas. Os primers internos iniciam a síntese primária de DNA e a seguinte síntese formada pelos primers externos liberam uma fita simples de DNA em forma de *loop*, o que é uma característica da amplificação isotérmica. *Primers loop* amplificam essas regiões em grande quantidade. Devido à amplificação, ocorre a formação de precipitado derivado do pirofosfato de magnésio (produto da síntese de DNA). Para determinação do sexo dos embriões, a biopsia embrionária é dividida em dois tubos, um contendo *primers* macho-específicos e outro contendo *primers* genômicos, e em ambos os tubos há *primers loop*, os quais aceleram a reação. A formação de precipitado gera uma turbidez no tubo e a mensuração da mesma é realizada por absorvância. Quando os dois tubos revelam turbidez positiva, considera-se o embrião macho, caso não haja turbidez nos tubos, o resultado é interpretado como fêmea. O autor relata 100% de precisão na determinação do sexo de embriões produzidos *in vivo* e o tempo envolvido na determinação do sexo por essa metodologia é menor que uma hora.

Uma modificação dessa técnica foi proposta por Zoheir e Allam 2010, e a interpretação dos resultados pode ser realizada diretamente pela visualização em tubos. Para isso utilizaram brometo de etídio ou sulfato de cobre após o processo de amplificação como descrito por Hirayama et al. 2004. O brometo de etídio colore a reação diferentemente para cada sexo dependendo da quantidade de DNA amplificado, enquanto a adição de sulfato de cobre forma um precipitado em ligação aos dNTPs restantes da reação. Usando esse método na determinação do sexo de 58 embriões, os autores relatam uma acurácia de 100% quando o número de blastômeros utilizados na biopsia foi maior que três.

Esses resultados demonstram a possível simplificação das metodologias existentes para seleção do sexo de embriões no período pré-implantativo. É possível, com a busca de técnicas eficientes e rápidas, a utilização comercial da sexagem de embriões a campo.

4 CONCLUSÕES

A seleção do sexo dos bovinos é uma ferramenta que visa uma maior proporção de descendentes de determinado gênero, e favorece a produtividade de um empreendimento. Isso fica evidente na produção leiteira, já que o rebanho depende de fêmeas para reposição e o nascimento de machos não trazem benefícios para produção. A utilização da sexagem na pecuária de corte ainda não possui o mesmo impacto na busca da melhor produtividade, pois os custos relacionados com a técnica ainda são elevados e não permitiram sua larga aplicação no gado de corte.

A sexagem espermática possui muitas limitações. O processo de separação dos espermatozoides por citometria de fluxo causa danos às células e acaba diminuindo sua capacidade fecundante. Devido a esse fator e a baixa concentração da dose, o seu uso para inseminação artificial esta restrito às novilhas. Outra forma de utilização do sêmen sexado é na produção *in vitro* de embriões, permitindo seu uso de forma mais eficiente. Para maior utilização comercial do sêmen sexado é necessário o aprimoramento da técnica de separação espermática. A diminuição dos custos e melhores índices de prenhez relacionados com sêmen sexado poderá tornar mais acessível essa tecnologia aos produtores.

A sexagem de embrião é uma técnica pouco difundida em países como Brasil. Isso pode ser atribuído aos altos custos com aparelhagem e a dificuldade de sua aplicação a campo. A PCR é a metodologia empregada atualmente na determinação do sexo de embriões. O tempo envolvido com o procedimento de biopsia e com a amplificação do DNA prejudica a sua utilização na produção *in vivo* de embriões, porém, o mesmo não é evidenciado na técnica de PIV, pois o tempo de cultivo embrionário excede o tempo necessário para determinação do sexo pela PCR. A simplificação das metodologias utilizadas poderá tornar a sexagem de embriões uma técnica largamente utilizada.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, M.; da SILVA, A. R.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P.. **Ciência veterinária no Trópico**, Recife-PE, v. 11, n. 2/3, p. 49 – 56, 2008.
- BETTERIDGE, K. J.; HARE, W. C. D.; SINGH, E. L. Approaches to sex selection in farm animals. In: BRACKETT, B. G. SEIDEL Jr., G. E.; SEIDEL, S. M. **New technologies in animal breeding**. Academic Press, New York. 109 p.
- BONDIOLI, K. R.; Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. **Journal Animal Science**. v. 70, n. 2, p. 19-29, 1992.
- BREDBACKA, P.; KANKAANPAA A.; PEIPPO, J. PCR - sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, v. 44, p.167-176, 1995.
- BLOTTNER, S.; SCHWERIN, M.; BÖTTCHER, M. Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll density gradient. **Arch. Tierz.**, v.36, n.2, p.153-62, 1993.
- BRACKETT, B. G; BOUSQUET, D; BOICE, M. L. Normal Development Following *in vitro* Fertilization in Cow. **Biology of Reproduction**. v. 27, p. 147-158, 1982.
- CARBONNEAU, G.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 63-75, 1997.
- CARDOSO, C. R. S.; BUTZKE, G. Comparação dos índices de gestação entre embriões intactos e biopsiados (sexados) a campo, considerando o estágio e a qualidade dos embriões. **An. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 2010.
- CHEBEL, R. C.; GUAGNINI, F. S.; SANOS, J. E. P. Sex sorted semen for dairy heifers. Effects on reproductive and lactational performance. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2496-2507, 2010.
- CRAN, D. G.; COCHRANE, D. J.; JOHNSON, L.; WEI, H.; LU, K. H. POLGE, C. Separation of x and Y chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. **Theriogenology**, v. 41, p. 183, 1994.
- CRAN, D. G.; COCHRANE, D. J.; JOHNSON, L.; MILLER, N. G. A.; POLGE, C. Production of bovine calves following separation of X and Y chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. **Vet Rec** v. 132, p. 40-41, 1993.
- DODE, M. A. N; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 26, p. 32-37, 2002
- GARDNER DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.
- GARDNER, D. L.; EDWARDS, R. G. Control of the sex ratio at full term in the rabbit transferring sexing blastocysts. **Nature**. v. 218, p. 346-348, 1968.

GARDNER, D.L.; SEIDEL Jr, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 886-895, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA M. A. L.; MONTANGER, M. M.; COSTA, L. F. S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, 1 ed. São Paulo, p 195-226, 2001.

GONÇALVES, P. B. D; OLIVEIRA, M. A. L; MEZZALIRA, A; MONTAGNER, M. M; VISINTIN, J.A; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In GONÇALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008.

GOSÁLVEZ, J. A.; RAMIREZA, M. A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A. C.; CRESPO, F. B.; EVANS, C. K.; KJELLAND,C.; MORENO, J. F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features **Theriogenology**, article in press,2010.

HAYAKAWA, H. A.; HIRAI, T. B., TAKIMOTO, A. A.; IDETA, A. C.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology** v.71, p. 68–73, (2009).

HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; MORIYASU, S.; SAWAI, K.; ONOE, S.; TAKAHASHI, Y.; KATEGIRI, S.; TOEN, K. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop mediated isothermal amplification. **Theriogenology**, v. 62, p.887-896, 2004.

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

HOLLINSHEAD, F. K.; O'BRIEN, J. K.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome bearing spermatozoa. **Reproduction Fertility Developing**, 2002.

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

JU, J.; CHAUBAL, S.A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 39–47, 2009.

KCRO G. C.; GOLDBERG E. H. H-Y (male) antigen: detection on eight cell mouse embryos. **Science**, p. 1134-1135, 1976.

KURYKIN, J.; JAAKMA, U.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; WALDMANN, A.; MAJAS, L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers **Theriogenology** v. 67, p. 754–759, 2007.

LARSON, J.E.; LAMB, G.C.; FUNNELL, B.J.; BIRD, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J.C. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. **Theriogenology** v. 73, p. 698-703, 2010.

LOPES, R. F. F.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L.. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. **Theriogenology**, v.56, n. 9, p. 1383-1392, 2001.

LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL Jr, G. E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v.52, p. 1393–1405, 1999.

LUZ, M. R.; WATANABE, Y. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; MAURO, S. M. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; FRANCESCHINI, P. H. Sexagem de embriões bovinos fecundados *in vitro* pela técnica de PCR *Multiplex*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37. n. 36. São Paulo, Dezembro, 2000.

MATTHEW B. WHEELER A,B,D, JACK J. RUTLEDGE C,AMY FISCHER-BROWN A,C, TARA VANETTEN A,SAMANTHA MALUSKY A, DAVID J. BEEBE Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, v.65, p219-227, 2006.

MONK,M.; HANDYSIDE, A. H. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, n. 1, p. 365-368, 1988.

MOCÉ, E., GRAHAM J.K, SCHENK, J.L Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction, **Theriogenology**, 2006.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

PALMA, G. A. **Biotecnología de la reproducción**. Buenos Aires: EEA Balcarce, p. 997, 2001.

PANARACE M, MEDINA M, CATTANEO L, CABALLERO J, CERRATE H, DALLA LASTA , M. Embryo production using sexed semen in superovulated cows and heifers. **Theriogenology**, v. 59, p. 513, 2003.

PARK, J. H.; LEE, J. H.; CHOI, K. M.; JOUNG, S. Y.; KIM, G. M. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (pcr) with biopsied single blastomere **Theriogenology**, v. 55, p. 1643-1653, 2001.

REGITANO, L. C. A. Introdução a análise de marcadores moleculares. InREGITANO, L. C. A; COUTINHO, L. L. **Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal**. Brasília-DF: Embrapa Cenargen, 2001.

REMILLARD, R. Sistemas integrados de producción de embriones con sexo predeterminado. **VII Simpósio Internacional de Reproducción Animal**. p. 147-154, 2007

SARTORI , R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86–90, 2004.

SCHENK, J. L.; BRINK, Z.; SUH, T. K. Use of competitive fertilization to evaluate a simple laser for flow cytometric sexing of bovine sperm. **Reproduction Fertility and Development** v. 17, p.306, 2005.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G. *et al.* Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.52,n.8, p.1375-93, 1999.

SEIDEL JR, G.E.; L. A. JOHNSON. Sexing mammalian sperm-overview. **Theriogenology** v.52 p.1267-1272, 1999

SEIDEL G.E.. Overview of sexing sperm. **Theriogenology** v.68 p.443-446, 2007

SEIDEL JR, G. E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science** v. 105, p. 129–138, 2008.

SOUSA, R. V. **Efeito da micromanipulação para identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro***. Brasília (Dissertação de Mestrado): Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária: Universidade de Brasília, 2007, 47 p.

TAYLOR St., C.S., THIESSEN, R.B.; MOORE, A.J. Single sex beef cattle systems. In: SMITH, C., KING, J.W.B., McKAY, J.C.(Ed). **Exploiting New Technologies in Animal Breeding**, Oxford: Oxford University Press, 1986. p.183-93.

THIBIER, M; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, v. 43, p. 71-60, 1995.

TUBMAN, L.M.;BRINK, Z.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Normality of calves resulting from sexed sperm. **Theriogenology**, 2003

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; EBSWORTH, M.; MAXWELL. W. M.; EVANS, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Animal Reproduction Science** v. 118, p. 7–12, 2010.

VAN VLIET, R. A.: VERRINDER GIBBINS, A. M.; WALTON, J. S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**. V. 32, n. 3, p. 421-438, 1989.

WELSH, G. R.; HOUCK, D. W.; JONHSON, L. A. Fluidic and optical modification ta o FACS IV for flow sorting of X and Y bearing sperm based on DNA cytometry. v. 18, p.74, 1994.

WILSON, R. D.; WEIGI, K. A.; FRCKE, P. M.; RUTLEDGE, J. J. LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; MATTHEWS, D. L.; SCHUTZKUS, V. R. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 776-782, 2005.

WILSON, R. D.; FRICKE, P. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; RUTLEDGE, J. J.; SYVERSON PENFIELD, C. M.; WEIGEL, K. A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. **Theriogenology** v. 65, p. 1007–1015, 2006.

WACHTEL, S. S. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. **Theriogenology**, v.21, p. 18-28, 1984.

XU, J.; GUO, L.; SU, T. L.; ZHANG, J; SCHENK, J. F. MORENO, A. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex sorted sperm. *Journal of Dairy Science*. v. 89, n. 7, p. 2510- 2518, 2006.

ZHANG, M.; LU, K. H.; SEIDEL, G. E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**; v. 60, p. 1657–1663, 2003.

ZOHEIRA, K. M. A.; ALLAM, A. A. A rapid method for sexing the bovine embryo. **Animal Reproduction Science** v.119, p. 92–96, 2010.