

Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões¹

Sexed semen: artificial insemination and embryo transfer

Pietro Sampaio Baruselli², Alexandre Hênryli de Souza¹, Claudiney de Melo Martins¹, Lindsay Unno Gimenes¹, José Nélío de Sousa Sales¹, Henderson Ayres¹, André Furugen Cesar de Andrade¹, Cláudia Fernandes Raphael¹, Rubens Paes de Arruda¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

²Correspondência: barusell@usp.br

Resumo

A separação dos espermatozóides “machos” (cromossomo Y) dos espermatozóides “fêmeas” (cromossomo X) é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células (espermatozóide fêmea possui 4% mais material genético que o espermatozóide macho). O citômetro de fluxo emite um feixe de raios laser que promove fluorescência das células espermáticas previamente coradas, permitindo a separação dos espermatozóides X e Y com membrana celular íntegra. Essa revisão apresenta os dados de literatura que trazem informações sobre essa biotecnologia, bem como resultados de pesquisas realizadas no Brasil com o emprego do sêmen sexado para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e superovulação com IATF em *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Palavras-chave: sêmen sexado, *Bos indicus*, IATF, superovulação.

Abstract

Currently, the separation of the Y-bearing chromosome sperm from the X-bearing chromosome sperm is possible due to differences in DNA content between these two cells (X-sperm has about 4% more genetic material than the Y-sperm). The flow cytometry associates fluorescent emission, that can control the position of the sperm cell during the sorting process. The objective of the current review is to present some basic scientific background regarding the semen sorting biotechnology, as well as to present some results from experiments performed in Brazil using sexed semen associated with timed artificial insemination (FTAI) and with timed AI after superovulatory treatments in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle.

Keywords: sexed semen. *Bos indicus*, FTAI, superovulation

Introdução

Em bovinocultura de corte e de leite, o sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o desempenho do agronegócio. Por exemplo, em fazendas produtoras de leite, o bezerro macho tem pouco ou nenhum valor zootécnico. Já, em fazendas de corte comerciais, o bezerro macho é mais interessante devido ao seu maior potencial de produção. Levando em consideração essas particularidades de manejo, muitas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de se prever e/ou manipular o sexo do bezerro. Uma biotecnologia já disponível em escala comercial é a utilização do sêmen sexado. A separação dos espermatozóides “machos” (com o cromossomo Y) dos espermatozóides “fêmeas” (com o cromossomo X) é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células espermáticas (o espermatozóide fêmea possui cerca de 4% mais material genético que o espermatozóide macho). Além disso, a forma e a área da cabeça dos espermatozóides dos bovinos facilitam a sua separação por meio de citometria de fluxo. O citômetro de fluxo associa a emissão de raios laser, a coloração diferencial dos espermatozóides viáveis e não viáveis e as forças hidrodinâmicas que direcionam o espermatozóide no momento da leitura durante o processo de separação dos espermatozóides X e Y. Recentes avanços na forma da ponteira do citômetro de fluxo, no posicionamento das células espermáticas no momento da passagem pelo laser, assim como modificações na pressão e no tipo de coloração das células também melhoraram o processo de separação dos gametas X e Y (Revisado em Garner *et al.*, 2006).

A velocidade de separação dos espermatozóides X e Y é relativamente lenta – aproximadamente 3000 a 4000 células por minuto para cada sexo. Desta forma, para a maior eficiência do processo, a dose de sêmen normalmente utilizada é de aproximadamente de 2×10^6 esptz/palheta. Existem relatos na literatura que relacionam certos comprometimentos na fertilidade com o menor número de espermatozóides por dose nos grupos inseminados com sêmen sexado ($1,5\text{--}2,0 \times 10^6$ esptz/dose) em comparação com a quantidade de espermatozóides utilizada nos grupos submetidos à inseminação com sêmen convencional ($\sim 10 \times 10^6$ esptz/dose). Porém, alguns pesquisadores que utilizaram a mesma quantidade de espermatozóides por dose inseminante

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

encontraram menores taxas de prenhez nos grupos tratados com sêmen sexado (Doyle *et al.*, 1999).

Existem muitas diferenças entre as raças de bovinos quanto às características do cromossomo Y. Por exemplo, a Fig. 1 (adaptada de: Garner *et al.*, 2006) ilustra a diferença na quantidade de material genético (DNA) entre o cromossomo X e Y conforme a raça de bovinos. Devido à essas diferenças, podem ser verificados resultados variáveis com relação à eficiência do processo de separação dos espermatozoides X e Y, assim como nos resultados de prenhez após a utilização de sêmen sexado em raças Taurinas e Zebuínas.

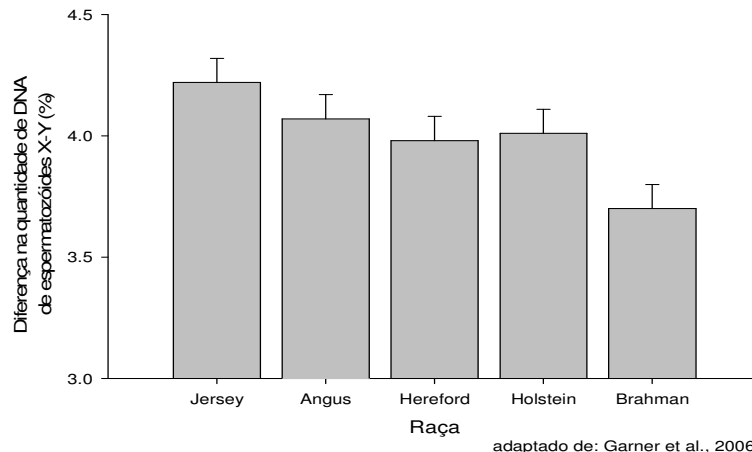


Figura 1. Diferença na quantidade de material genético (DNA) entre o cromossomo X e Y conforme a raça de bovinos.

Portanto, a seguir estaremos apresentando dados de algumas pesquisas recentes que avaliaram o desempenho do sêmen sexado em animais de corte (*Bos taurus* e *Bos indicus*) e de leite (*Bos taurus*) inseminados após detecção de cio, após a sincronização da ovulação e inseminação em tempo fixo (sem detecção de cio), e após tratamentos superovulatórios.

Gado de corte

Taxa de concepção após a IA com sêmen sexado (com detecção de cio)

Em uma revisão feita por Seidel *et al.* (1999), novilhas de corte cruzadas quando inseminadas com sêmen sexado apresentaram taxas de concepção na ordem de 40%. O resultado foi inferior aos resultados obtidos com o uso do sêmen convencional (75%). Nessa mesma revisão foi apresentado um segundo estudo com maior número de novilhas cruzadas (n=207), as quais foram divididas nos seguintes grupos experimentais: 1) Sêmen sexado – IA no corpo uterino (1.5×10^6 esptz/dose), 2) Sêmen sexado – IA no corno uterino (1.5×10^6 esptz/dose), 3) Sêmen convencional – IA no corpo uterino (20×10^6 esptz/dose). As taxas de concepção foram de 40%^a, 62%^b e 51%^{a,b} para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Estes resultados indicam que quando a dose de sêmen sexado é baixa ($\leq 1.5 \times 10^6$ esptz/dose) a deposição do sêmen profundamente no corno uterino parece apresentar melhores resultados que a inseminação no corpo do útero. No entanto, esse autor ainda descreve em um terceiro experimento (n=122), feito com novilhas Angus, no qual as taxas de concepção para os seguintes grupos: 1) Sêmen sexado – IA no corpo uterino (1.0×10^6 esptz/dose), 2) Sêmen sexado – IA no corpo uterino (3.0×10^6 esptz/dose), 3) Sêmen convencional – IA no corpo uterino (20×10^6 esptz/dose), foram similares e, respectivamente, de 59%, 53% e 57%.

O uso de sêmen sexado em vacas de corte no pós-parto não foi muito explorado cientificamente, sendo que a maioria dos artigos utilizou pequeno número de vacas por tratamento, tornando os resultados pouco conclusivos. Um experimento realizado por Doyle *et al.* (1999) em vacas Angus lactantes (n=212) comparou os seguintes tratamentos: 1) Controle A – sêmen convencional congelado (40×10^6 esptz/dose); 2) Controle B – sêmen convencional congelado com baixa dose (1×10^6 esptz/dose); 3) Sêmen sexado congelado (1×10^6 esptz/dose); e 4) Sêmen sexado refrigerado (5×10^5 esptz/dose). O sêmen para o primeiro tratamento foi colocado no corpo do útero; para os outros tratamentos, metade do sêmen foi colocado em cada corno uterino. Os resultados de prenhez foram menores para os grupos que receberam inseminação com sêmen sexado (Sexado congelado= 23%; Sexado refrigerado=25%) quando comparado aos grupos que receberam sêmen convencional (Convencional=67%; Convencional baixa dose=49%).

Taxa de concepção após a IATF com sêmen sexado (sem detecção de cio)

Atualmente, são raras as publicações que tentam relacionar taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Porém, é sabido que uma das possíveis razões da diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de

viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (Schenk *et al.*, 2006). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menor tempo para a capacitação devido ao processo de separação por citometria de fluxo (Lu *et al.*, 2004). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado. Vacas de corte e de leite sincronizadas com progestágenos e estradiol, ovulam cerca de 70-72h após a retirada dos implantes (Souza *et al.*, 2006, Baruselli *et al.*, 2006a).

Baseado nesses princípios, nosso grupo de pesquisa em parceria com a Sexing, Lagoa da Serra e Intervet realizou um experimento em vacas Nelore (*Bos indicus*), no qual a inseminação foi realizada em tempo fixo com o sêmen convencional (40×10^6 esptz/dose) ou com sêmen sexado (2.1×10^6 esptz/dose) em 2 horários: 54h (16-18 horas antes da ovulação) ou 60h (10-12 horas antes da ovulação) após retirada do implante de progestágeno. Nossa hipótese era de que a IATF próxima à ovulação aumentaria a taxa de concepção do sêmen sexado. Isso devido a dose de sêmen sexado possuir menor concentração, além de indícios de que apresenta menor tempo de viabilidade e menor tempo para capacitação no trato reprodutivo.

Nesse experimento, o sêmen foi preparado levando em consideração cada ejaculado. No laboratório, os ejaculados foram divididos, e parte foi destinada para congelamento tradicional e parte para o processo de sexagem e posterior congelamento.

Foram utilizadas 389 vacas Nelore recém paridas (em média 45 dias pós-parto) como unidades experimentais. Os resultados foram indicativos de que não existem diferenças na taxa de concepção quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 60 horas após a retirada do implante de progestágeno (Fig. 2), confirmando a hipótese inicial desse experimento. Além disso, também foi constatado que não houve diferença na taxa de concepção entre o uso do sêmen convencional (58,9%), sexado-X (52,0%) e sexado-Y (49,0%; Fig. 3), indicando eficiência semelhante para o sêmen sexado para macho e para fêmea. Os resultados da sexagem fetal apontaram 93,9% de eficiência para determinação do sexo. Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa, o atraso na IATF aumentou 9,0% a taxa de concepção no grupo de animais inseminados com o sêmen sexado.

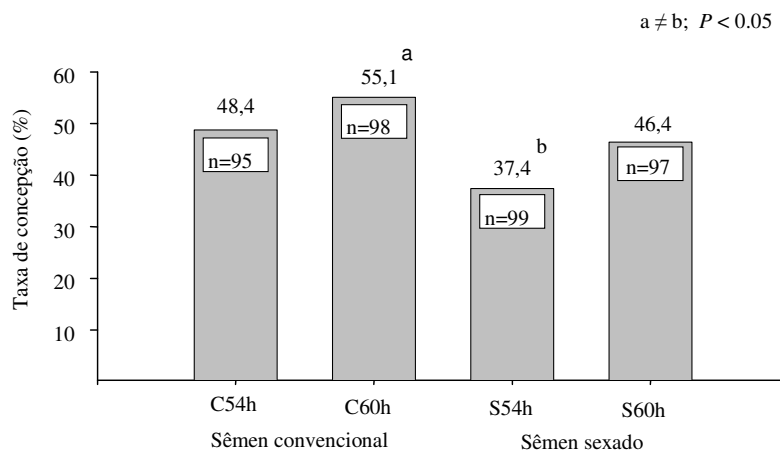


Figura 2. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do implante de progestágeno) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

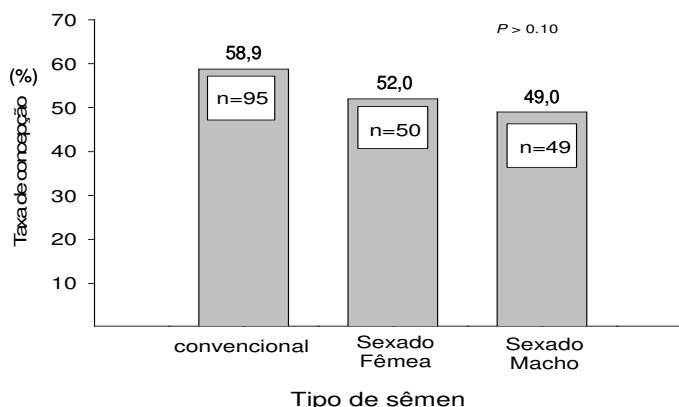


Figura 3. Efeito principal do tipo de sêmen (Convencional, Sexado-X e Sexado-Y) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Gado de leite

Taxa de concepção após a IA com sêmen sexado (com detecção de cio)

Atualmente, não existem muitos estudos delineados para testar a taxa de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de leite de alta produção em lactação. Em geral, a taxa de concepção após o uso deste tipo de sêmen é de cerca 50% a 60% da taxa de concepção verificada com o uso de sêmen convencional. Em um estudo, que utilizou mais de 300 vacas de leite de alta produção (Andersson *et al.*, 2004, as quais foram inseminadas após a detecção do estro com sêmen sexado (2×10^6 esptz/dose, $n = 157$) ou sêmen convencional (15×10^6 esptz/dose, $n = 149$), a taxa de prenhez foi de 21% para o grupo inseminado com o sêmen sexado e de 46% para o grupo inseminado com sêmen convencional. Apesar dos menores índices de prenhez, a utilização do sêmen sexado foi efetiva em aumentar a quantidade de bezerras fêmeas nascidas (sexado = 82%; convencional = 49%). Ainda, os autores relataram que não ocorreram diferenças na viabilidade dos animais nascidos entre os grupos experimentais. Outros autores argumentam que uma das causas da baixa taxa de concepção no grupo inseminado com sêmen sexado poderia ser a baixa concentração de espermatozoides por dose de sêmen. Porém, em outro experimento (Bodmer *et al.*, 2005), que utilizou a mesma concentração de espermatozoides por IA em vacas em lactação inseminadas 12h após detecção de cio, as taxas de concepção aos 30-40 dias foram similares entre os grupos sexado (27.6%, $n=105$) e convencional (28.1%, $n=64$).

Apesar dos resultados apresentados na literatura com vacas de leite serem inconsistentes, a maioria das pesquisas realizadas com novilhas de leite indica que a taxa de concepção após observação de cio e IA com sêmen sexado é de cerca de 70 a 90% da taxa atingida após o uso de sêmen convencional (revisado em: Seidel *et al.*, 1999). Os autores discutem, ainda, que os resultados dependem das condições de manejo das fazendas. Seidel *et al.* (1999) relataram, em uma combinação de vários experimentos, que as taxas de concepção de novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado variaram de 40% a 68% e com sêmen convencional de 67% a 82%. Uma estratégia que pode ser utilizada por produtores de leite é o uso do sêmen sexado em novilhas. Os produtores de leite podem realizar a primeira inseminação pós puberdade com o uso do sêmen sexado, e as inseminações seguintes com sêmen convencional. Assim, é possível diminuir os problemas no pós-parto (pois bezerras fêmeas causam menos problemas de parto) e aumentar a proporção de fêmeas nascidas de primíparas para cerca de 65% (Weigel *et al.*, 2004).

O local de deposição do sêmen sexado também foi estudado em novilhas de leite. Por exemplo, Kurykin *et al.* (2007) compararam a taxa de prenhez após a deposição do sêmen sexado em diferentes locais no trato uterino de novilhas de leite. Neste experimento, as novilhas foram inseminadas 80-82h após a segunda dose de PGF2 α (primeira dose de PGF2 α 14 dias antes da segunda dose) com sêmen sexado (2.2×10^6 sptz/palheta). O lado da ovulação foi determinado por exame ultra-sonográfico. Os grupos experimentais foram:

1. IA **convencional no corpo** uterino: inseminação artificial convencional no corpo do útero;
2. IA **no meio do corno uterino**: deposição na parte mediana do corno uterino, no lado esperado da ovulação;
3. IA **no final do corno uterino**: deposição do sêmen próximo a junção útero-tubárica com a ajuda de um aplicador para transferência de embriões, no lado esperado da ovulação.

Como se pode verificar na Tab. 1, as taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de novilhas de leite.

Os resultados são indicativos de que o local de deposição do sêmen sexado parece não afetar as taxas de prenhez quando se utiliza uma dose inseminante de pelo menos $2,2 \times 10^6$ sptz em novilhas.

Tabela 1. Taxa de prenhez aos 30-32 dias em novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado depositado em diferentes locais do útero 80-82 h após a segunda injeção de PGF2 α .

Touros	IA Corpo Uterino (%)	IA no meio do Corno Uterino (%)	IA no Final do Corno Uterino (%)	Taxa de prenhez (%)
Touro A	35,4 (17/48)	46,7 (14/30)	39,4 (13/33)	39,6 (44/111)
Touro B	48,8 (21/43)	51,9 (14/27)	39,3 (11/28)	46,9 (46/98)
Total	41,8 (38/91)	49,1 (28/57)	39,3 (24/61)	43,1 (90/209)

Fonte: Adaptado de Kurykin *et al.*, 2007.

Deposição do semen no útero: IA corpo uterino: inseminação artificial convencional no corpo do útero; IA no meio do corno uterino: deposição na parte mediana do corno uterino; IA no final do corno uterino: deposição do sêmen próximo a junção útero-tubárica.

Taxa de concepção após a IATF com sêmen sexado (sem detecção de cio)

Nosso grupo de pesquisa realizou o mesmo experimento citado anteriormente para vacas de corte (tipo de sêmen vs. momento da IA) em 245 vacas de leite de alta produção sincronizadas e inseminadas em tempo fixo durante o verão (dezembro de 2006 e janeiro de 2007). Os resultados preliminares são indicativos de que as taxas de concepção após IATF em vacas de leite de alta produção inseminadas com sêmen sexado tenderam a serem menores que animais inseminados com sêmen convencional. Verificou-se 21,3% de concepção para o sêmen convencional e de 9,8% para o sêmen sexado ($P < 0,10$). A fig.4 mostra a taxa de concepção de acordo com os diferentes grupos experimentais. Os resultados, semelhantemente ao verificado no experimento com Nelore, foram indicativos de que não existem diferenças na taxa de concepção entre os grupos inseminados com sêmen convencional (54 ou 60 horas) e o grupo inseminado com sêmen sexado 60 horas após a retirada do implante de progestágeno.

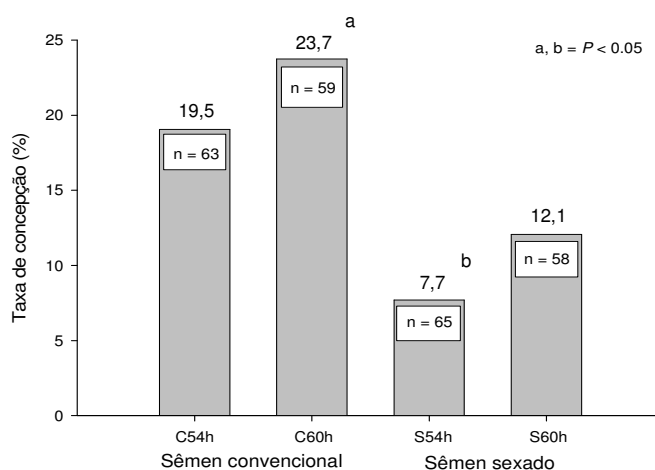


Figura 4. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do implante de progestágeno; 16 a 18 h ou 10 a 12 h antes da ovulação) e do tipo de sêmen na taxa de concepção após IATF em vacas de leite de alta produção.

Apesar de não diferir estatisticamente, o grupo inseminado com sêmen sexado 60h após a retirada do implante de norgestomet (10 a 12h antes da ovulação), apresentou incremento de 4,4% na taxa de concepção (7,7 vs 12,1%), comparado com o grupo que recebeu a IATF com sêmen sexado 54h após a retirada do implante. Os resultados relativamente baixos à IATF verificados nesse experimento são freqüentemente encontrados em vacas de leite de alta produção inseminadas durante o verão, principalmente em países tropicais.

Transferência de embriões

Uso do sêmen sexado em animais superovulados

A viabilidade e a concentração de sêmen utilizados em procedimentos de transferência de embriões são muito importantes, pois animais submetidos à tratamentos superovulatórios apresentam, em geral, menores taxas de fertilização de oócitos que animais não superovulados (Page *et al.*, 1985; Saacke *et al.*, 1998). Portanto, existem muitas dúvidas quanto ao uso do sêmen sexado em animais superovulados, principalmente devido aos distúrbios relacionados ao transporte espermático no trato uterino. Desta maneira, a viabilidade do sêmen pode determinar o sucesso do programa de transferência de embriões (Newcomb, 1980).

Sartori *et al.* (2004), utilizando novilhas Holandesas, compararam a taxa de fertilização e qualidade embrionária após o uso do sêmen sexado ou do sêmen convencional em protocolos de superovulação associados ao uso de dispositivos intravaginais. Esses pesquisadores encontraram que a porcentagem de fertilização de oócitos foi maior para o grupo não sexado (~90%) que para os grupos inseminados com sêmen sexado (~60%). Nesse mesmo experimento, foi analisado o número de espermatozóides acessórios (espermatozóides presentes na zona pelúcida) em oócitos degenerados e não fertilizados. Foram encontradas maiores porcentagens de oócitos com presença de espermatozóide acessório no grupo não sexado. Isto pode indicar que o estoque espermático no oviduto dos animais que receberam sêmen sexado foi insuficiente para fertilizar os oócitos originados da superovulação.

Estudos recentes (Schenck *et al.*, 2006), avaliaram o efeito do tipo de sêmen (sexado vs. convencional) e de diferentes doses de sêmen sexado na quantidade e qualidade de embriões produzidos em vacas e novilhas de

corde, e em novilhas de leite superovuladas. No Experimento 1, foram utilizadas vacas e novilhas de corte da raça Angus. A superovulação foi iniciada no décimo dia do ciclo estral, e os animais foram inseminados 12h e 24h após a detecção de cio. Os grupos experimentais foram os seguintes: 1) Grupo não sexado (40×10^6 esptz/dose); 2) Grupo sexado (10×10^6 esptz/dose); Grupo sexado (2×10^6 esptz/dose). No Experimento 2, novilhas Holandesas foram inseminadas empregando os mesmos tratamentos, no entanto, com apenas uma dose de sêmen 70-72h após a o tratamento com PGF2 α .

No Experimento 1 (vacas e novilhas Angus), verificou-se que, na média combinada de vacas e novilhas, o grupo que recebeu o sêmen convencional apresentou significativamente maior porcentagem de oócitos fertilizados (69%), quando comparado aos grupos que receberam sêmen sexado com 10×10^6 esptz/dose (49%) e com 2×10^6 esptz/dose (40%). No Experimento 2 (novilhas de leite), o número de embriões transferíveis foi menor no grupo que recebeu o sêmen sexado na dose de 2×10^6 esptz/dose comparado com o grupo que recebeu sêmen convencional na dose de 40×10^6 esptz/dose. Porém, o grupo que recebeu sêmen sexado de 10×10^6 esptz/dose apresentou um número similar de embriões transferíveis comparado ao grupo que recebeu sêmen não-sexado de 40×10^6 esptz/dose. A taxa de concepção foi similar para embriões originados dos grupos sexado (67%, n=83) e não sexado (63%, n=102).

Resultados da utilização de sêmen sexado no protocolo de superovulação com IATF

Com o intuito de avaliar a produção de embriões em vaca Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado nosso grupo de pesquisa realizou um experimento também em parceria com a Sexing, Lagoa da Serra e Intervert. Os animais foram sincronizados com Crestar, associado a 2 mg de Benzoato de estradiol i.m. no dia 0. A superestimulação folicular foi induzida com FSH-p em 8 doses decrescentes de 12/12 horas, a partir do Dia 4. No Dia 6, administrou-se PGF2 α . Os implantes foram retirados 36 horas após a administração de PGF2 α , e o LH aplicado 48 horas após a PGF2 α (12 h após o último FSH). A IATF com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA) e convencional (40×10^6 esptz/IA) foi realizada 12 e 24 horas após a administração de LH. O sêmen foi produzido de um reprodutor levando em consideração cada ejaculado, semelhante aos experimentos anteriores. Adotou-se delineamento experimental *cross-over* para evitar variação individual das doadoras nos resultados. Os resultados estão apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Produção de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional, Cassilândia, MS, 2007.

	Sêmen Convencional (n=10)	Sêmen Sexado (n=10)	Valor de P		
			Trat	Rep	Trat vs Rep
Total de estruturas (n)	9,90 $\pm$ 0,78	8,40 $\pm$ 1,40	0,28	0,81	0,71
Emb., transferíveis (Grau 1, 2 e 3; n)	6,80 $\pm$ 0,66	4,20 $\pm$ 0,74	0,03	0,88	0,88
Emb., congeláveis (Grau 1 e 2; n)	5,90 $\pm$ 0,71	3,50 $\pm$ 0,65	0,03	0,43	0,99
Oócitos não fertilizados (n)	1,50 $\pm$ 0,48	3,70 $\pm$ 0,88	0,01	0,82	0,46
Degenerados (n)	1,60 $\pm$ 0,37	0,50 $\pm$ 0,16	0,04	0,54	0,78
Taxa de emb., transferíveis (%)	68,7 $\pm$ 6,3	50,0 $\pm$ 5,1	0,01	0,68	0,54
Taxa de emb., congeláveis (%)	59,6 $\pm$ 5,1	41,7 $\pm$ 5,2	0,02	0,32	0,73

Verificou-se diminuição do número de embriões transferíveis e congeláveis quando da utilização do sêmen sexado, além do aumento do número de embriões não fertilizados. Foi também observada diminuição na taxa de embriões transferíveis e congeláveis. Apesar da diminuição da produção de embriões com o emprego do sêmen sexado, com uma estimativa de 90% na acurácia de determinação do sexo, é possível produzir mais embriões do sexo de interesse com o emprego dessa biotecnologia (Fig. 5).

Nesse experimento parte dos embriões produzidos foi transferida à fresco em receptoras sincronizadas para receber um embrião em tempo fixo (Tab. 3). Verificaram-se taxas semelhantes de prenhez, tanto com 30 quanto com 60 dias de gestação para embriões produzidos com sêmen sexado ou convencional. Após a sexagem por ultra-sonografia confirmou-se 90,0% de fêmeas para o sêmen sexado e 52,7% para o sêmen convencional. Novos estudos estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa na tentativa de realizar a IA mais próximo à ovulação em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* sincronizadas com o protocolo de superovulação e inseminadas com sêmen sexado em tempo fixo (Baruselli *et al.*, 2006b).

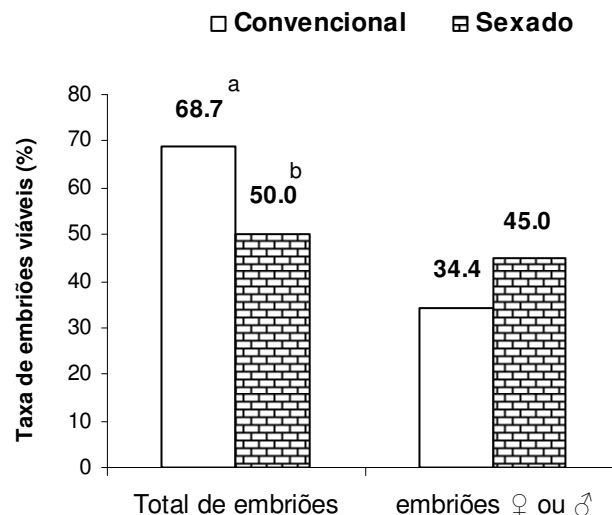


Figura 5. Estimativa de produção de embriões transferíveis (macho ou fêmea) com o emprego de sêmen convencional e sexado em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (estimativa de 90% de acurácia na sexagem).

Tabela 3 - Taxa de prenhez aos 30 e 60 dias de gestação de embriões provenientes de inseminação com sêmen convencional e sexado e porcentagem de fêmeas na sexagem fetal.

Embriões produzidos	n	Taxa de prenhez 30 dias (%)	Taxa de prenhez 60 dias (%)	Sexagem fetal (% de fêmeas)
Sêmen convencional	68	57,3 (39/68)	52,9 (36/68)	52,7 (19/36)
Sêmen sexado	42	57,1 (24/42)	47,6 (20/42)	90,0 (18/20)

Avaliação do sêmen sexado empregado no experimento

As análises das partidas de sêmen utilizadas nos experimentos foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP no Campus de Pirassununga. Os dados estão apresentados na Tab. 4. Verificou-se que o sêmen convencional e sexado utilizados nos experimentos apresentam-se dentro dos padrões recomendados.

Tabela 4. Análise laboratorial do sêmen empregado nos experimentos.

	Gado de corte			Gado de Leite			
	C	M	F	C 1	C 2	F 3	F 4
Motilidade (%)	55	40	40	60	65	35	50
Vigor (1-5)	2	2	2	3	3/4	2/3	2/3
Concentração/palheta (x10 ⁶)	38,75	2,1	2,1	18,13	41,25	2,1	2,1
Esptz móveis/palheta (x10 ⁶)	21,31	0,96	0,96	10,88	26,81	0,74	1,05
Defeitos Menores (%)	4,0	2	0	4,0	1,0	0	0
Defeitos Maiores (%)	8,5	3,0	8,0	12,0	15,0	8,0	6,0
Defeitos Totais (%)	12,5	5	8,0	16,0	16,0	8,0	6,0
MPI (%)	51,0	77,0	74,0	53,5	43,5	37,0	44,0
MAI (%)	69,5	89,5	87,0	75,5	76,5	70,0	77,5
MMAI (%)	58,0	54,5	75,0	56,0	49,0	43,0	43,0
PIAIC (%)	47,5	54,0	70,0	51,0	43,0	32,0	40,0

PIAIC – Membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e membrana mitocondrial com alto potencial; MPI – Membrana plasmática íntegra; MAI – Membrana acrossomal íntegra; MMAI – Membrana mitocondrial com alto potencial.

C – sêmen convencional; M – sêmen sexado “macho”; F – sêmen sexado “fêmea”

Conclusão

Os resultados dos experimentos apresentados são indicativos de que as taxas de concepção após detecção de cio em novilhas de corte e de leite inseminadas com sêmen sexado são aceitáveis. A taxa de prenhez após o uso da sincronização da ovulação para IATF com sêmen sexado foi semelhante à obtida com sêmen convencional, desde que realizada 60 horas após a retirada do implante (10 horas antes da ovulação), tanto em vacas Nelore quanto em vacas de holandesas de alta produção em lactação. O uso do sêmen sexado em animais superovulados pode ser economicamente viável em algumas situações, na qual a produção de embriões de um determinado sexo tem que ser maximizada. É importante salientar que existe grande variação individual na fertilidade de touros submetidos ao processo de sexagem, que deve ser levada em consideração no momento da escolha do reprodutor para programas de inseminação artificial e de transferência de embriões. Mais experimentos são necessários para compreender melhor os fatores que afetam a fertilidade do sêmen sexado em bovinos.

Agradecimentos

À Sexing, à Lagoa da Serra e à Intervet pela parceria que possibilitou o desenvolvimento dos experimentos realizados no Brasil pela nossa equipe.

Referências

- Andersson M, Taponen J, Koskinen E, Dahlbom M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, v.61, p.1583-1588, 2004.
- Baruselli PS, Ayres H, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Torres-Júnior JRS. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. *Anais ...* São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2006a. v.1, p.113-132.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LFT, Nogueira MFG, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006b.
- Bodmer M, Janett F, Hassig M, den Daas N, Reichert P, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1647-1655, 2005.
- Doyle SP, Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickho LA, Cran DG, Green RD. Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science, v.50, p.203-205, 1999.
- Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v.65, p.943-957, 2006.
- 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.
- Lu KH, Seidel Jr GE. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-830, 2004;
- Newcomb R. Investigation of factors affecting superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Friesian cows. *Vet Rec*, v.106, p.48-52, 1980.
- Page RD, Jordan JE, Johnson SK. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Follitropin. *Theriogenology*, v.31, p.236, 1985.
- Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, v.50, p.117-128, 1998.
- Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*, v.1, p.86-90, 2004.
- Schenk JL, Suh TK, Seidel Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, v.65, p.299-307, 2006.
- Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1407-1420, 1999.
- Souza AH, Martins CM, Torres-Jr JR, Ayres H, Baruselli PS. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção. *Acta Sci Vet*, v.34, p.404, 2006 Resumo.
- Weigel KA. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems. *J Dairy Sci*, v.87, p.E120-E130, 2004.