PROPORÇÃO DO SEXO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS (*Sex ratio in vitro production of bovine embryos*)

Marcus Vinícius Galvão Loiola, Alexandra Soares Rodrigues, Marcos Chalhoub, Priscila Assis Ferraz, Rodrigo Freitas Bittencourt, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho

*Correspondência: vinicius_mev@hotmail.com

RESUMO: Objetivou-se avaliar a proporção do sexo utilizando espermatozoides provenientes de sêmen convencional ou sexado para fêmea em um programa de produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos. Foram utilizados oócitos de 87 doadoras *Bos taurus indicus* da raça Nelore, obtidos por sistema de aspiração folicular transvaginal guiado por ultrassonografia. Os oócitos selecionados foram maturados *in vitro*, fertilizados com espermatozoides oriundos de sêmen convencional (grupo 1 – CONV) ou sêmen sexado para fêmea (grupo 2 – SEX) e os embriões produzidos foram então cultivados *in vitro* por sete dias. Após o cultivo, os mesmos foram envasados e inovulados em receptoras mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*. Foram transferidos 1.319 embriões, sendo 1.081 produzidos com sêmen convencional (CONV) e 238 com sêmen sexado de fêmea (SEX). O diagnóstico precoce de gestação e a sexagem fetal foram realizados por ultrassonografia transretal. A taxa de gestação total foi 37,38% (493/1.319), sendo 37,74% (408/1.081) no grupo CONV e 35,71% (85/238) no grupo SEX. A proporção do sexo no grupo CONV foi desviada ($P=0,002$) a favor dos machos (57,84% de machos e 42,16% de fêmeas) e no grupo SEX ocorreu um desvio na proporção ($P=0,001$) a favor das fêmeas (68,24% de fêmeas e 31,76% de machos). Concluiu-se que a utilização do sêmen convencional em PIVE bovinos elevou a proporção de produtos machos e apesar da utilização de sêmen sexado de fêmea ser uma alternativa para pré-selecionar o sexo dos produtos, ainda houve uma considerável taxa de machos quando se utilizou este tipo de sêmen.

Palavras-chave: biotecnologia da reprodução; bovinocultura; FIV; nelore.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the sex ratio using sperm from conventional or sexed semen to female in a program of in vitro production of embryos (PIVE) cattle. Oocytes from 87 donors were used *Bos taurus indicus* Nelore obtained by transvaginal follicular aspiration system guided by ultrasound. The selected oocytes were matured in vitro, fertilized with sperm derived from conventional semen (group 1 - CONV) or female sexed semen (group 2 - SEX) and the embryos were then cultured in vitro for seven days. After cultivation, they were packaged and ovulated on receiving crossbred *Bos taurus* x *Bos taurus indicus*. Transferred 1,319 embryos, with 1,081 produced with conventional semen (CONV) and 238 with female sexed semen (SEX). Early pregnancy diagnosis and fetal sexing were performed by transrectal ultrasonography. The overall pregnancy rate was 37.38% (493/1.319) and 37.74% (408/1.081) in CONV group and 35.71% (85/238) in group SEX. The sex ratio was skewed in the CONV group ($P=0.002$) in favor of males (57.84% male and 42.16% female) and SEX group was a shift in the proportion ($P=0.001$) in favor of females (68.24% female and 31.76% male). It was concluded that the use of conventional semen in cattle PIVE increased the proportion of males and products despite the use of sexed semen female be an alternative to pre-select the sex of products, although there was a considerable rate of males when using this type of semen.

Key Words: biotechnology of reproduction; cattle; IVF; nelore.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte brasileira encontra-se em um grande momento. De acordo com o ABIEC (2012) o Brasil é o maior exportador de carne comercializada e possui o maior rebanho comercial do mundo, chegando a mais de 213 milhões de animais (IBGE, 2011). Estes fatos são atribuídos à intensa utilização de tecnologias de melhoramento genético, o que contribui para o aumento da produtividade dos rebanhos (MEIRELLES *et al.*, 2008). Neste contexto, destacam-se as biotecnologias da reprodução, em particular a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que tem um papel significativo na reprodução animal (WATANABE *et al.*, 2002).

A PIVE se destaca em relação a outras biotécnicas, devido ao seu grande potencial e rapidez para a multiplicação de descendentes de animais geneticamente superiores, sendo um instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos em programas de melhoramento genético animal (VARAGO *et al.*, 2008). O Brasil tornou-se referência mundial na área da reprodução animal, com grandes avanços e vasta aplicação da PIVE (VIANA e CAMARGO, 2007). Em 2011 o total de embriões produzidos *in vitro* chegou a 318 116, superando o número de embriões produzidos *in vivo* no país e equivalendo a 86% de todos os embriões produzidos *in vitro* no mundo (MAPLETOFT, 2013).

Entretanto, apesar do seu grande potencial, esta biotecnologia ainda apresenta limitações. A taxa de embriões que atingem o estágio transferível (mórula e blastocisto) permanece baixa, variando entre 20 a 50% (GONÇALVES *et al.*, 2008), anormalidades fetais e neonatais provenientes da menor qualidade dos embriões *in vitro*, quando comparados aos produzidos *in vivo*

(LONERGAN, 2008) e baixo índice de desenvolvimento embrionário após o processo de criopreservação (SENEDA *et al.*, 2006), são desafios que precisam ser superados.

Entre as limitações encontradas, existe ainda, o desvio na proporção do sexo, com a porcentagem de embriões machos superiores à teoricamente esperada de 50% para cada um dos sexos (GUITIERREZ-ADAN *et al.*, 2001a). Esta característica é considerada um entrave na PIVE bovinos, uma vez que, a maior frequência de machos nos produtos oriundos desta técnica nem sempre é desejada (RUFINO *et al.*, 2006).

Sendo assim, diferentes estratégias são traçadas na tentativa de selecionar-se o sexo dos produtos oriundos de fertilização *in vitro* (FIV), entre estas destacam-se: a separação de espermatozoides portadores do cromossomo X, daqueles portadores do cromossomo Y e a sexagem de embriões pré-implantados através de técnicas de biologia molecular (HOSSEPIAN DE LIMA, 2007). A sexagem de espermatozoides em bovinos vem se aperfeiçoando nos últimos anos, os desenvolvimentos recentes e melhorias na técnica de citometria de fluxo tornaram essa tecnologia de aplicação comercial, permitindo a seleção do sexo de interesse, com boa acurácia (XU *et al.*, 2009).

Tendo em vista o desvio da proporção do sexo como uma problemática na PIVE bovinos e a tecnologia de sêmen sexado como uma alternativa para selecionar o sexo desejado dos seus produtos, objetivou-se com este trabalho avaliar a proporção do sexo em bovinos utilizando espermatozoides provenientes de sêmen convencional ou sexado de fêmea durante a FIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como doadoras de oócitos, 87 fêmeas *Bos taurus indicus* da raça Nelore, selecionadas com base no mérito genético. Estes animais apresentavam escore de condição corporal médio de $3,60 \pm 0,5$ (escala de 1-5), idade média de $7,00 \pm 4,1$ anos e tinham atividade ovariana regular (baseado em exame de palpação retal e ultrassonografia). Estes animais foram submetidos a sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*ovum pick up* - OPU), sendo que nenhum tratamento hormonal foi realizado antes das sessões.

Novilhas e vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) foram utilizadas como receptoras. Esses animais foram avaliados por exames ginecológicos e sanitários, receberam as vacinas obrigatórias e contra as principais doenças da esfera reprodutiva sendo mantidas a pasto com água e sal mineral à vontade.

O experimento ocorreu entre os anos de 2010 e 2011. Todos os animais que participaram (doadoras e receptoras) estavam em fazendas comerciais localizadas no estado da Bahia e a produção *in vitro* dos embriões ocorreu em um laboratório comercial no estado de São Paulo a uma distância aproximada de 2.000 quilômetros das fazendas onde estavam os animais.

As doadoras foram submetidas à OPU, utilizando-se equipamento de ultrassonografia (ALOKA SSD 500, Aloka, Japão) com transdutor microconvexo de 5MHz conectado a uma guia de biópsia com agulha hipodérmica de 19G (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil) e linha de aspiração (Corning, Acton, MA, EUA) em tubo de centrifuga de 50 mL aquecido (37°C). A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de aspiração (BV004, WTA, Cravinhos, Brasil), ajustada entre 72 e 78 mmHg,

permitindo um fluxo de 20 mL de meio/minuto.

Antes de cada procedimento foi realizada limpeza e assepsia da região perianal com água e álcool 70%. Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal foi feita anestesia epidural com 5 mL de Lidocaína a 2% (Pearson, São Paulo, Brasil). Em seguida o transdutor foi inserido até o fundo de saco vaginal e, com o auxílio da manipulação retal, os ovários foram posicionados para uma boa visualização dos folículos na tela do ultrassom.

Os folículos visualizados foram posicionados no percurso da linha de punção e então aspirados pela agulha conectada ao sistema com pressão negativa acionada pela bomba de vácuo. O mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visualizados em ambos os ovários. O meio de colheita dos oócitos, de lavagem da agulha e do sistema era composto de DPBS (Vitrocell, Campinas, Brasil) acrescido de 5,0 UI/mL de heparina sódica (Roche, Rio de Janeiro, Brasil).

O material aspirado foi transferido para um filtro de colheita de embriões (Vitrocell, Campinas, Brasil) e lavado com a mesma solução usada na aspiração. O sedimento restante no filtro foi transferido para placas de Petri (Vitrocell, Campinas, Brasil) e observado em microscópio estereoscópio (SZM 1000, Nikon, Melville, EUA), onde procedeu a busca e classificação dos oócitos de acordo com a sua morfologia (número de camadas e o grau de expansão das células do cumulus e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade) em grau I, II, III e IV segundo Seneda *et al.*, (2001). Os oócitos considerados viáveis (grau I, II e III) foram lavados em solução de TCM 199 Hepes (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA), suplementada com 10% de SFB (Vitrocell, Campinas, Brasil), 50 µg de gentamicina (Neoquímica, Anápolis, Goiás) e 2,2 µg

de piruvato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após esta etapa, iniciou a maturação *in vitro*, quando foram acondicionados em criotubos (Uniscience, São Paulo, Brasil) com 400 µL de meio de maturação constituído de TCM-199 bicarbonato (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA); suplementado com 10% de SFB (Vitrocell, Campinas, Brasil); 50UI de hCG/mL (Biodux, Campinas, Brasil); 0,5µg/mL de FSH (Vetrepharm, Belleville, Canada); 1 µg/mL de estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); 2,2 µg/mL de piruvato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 70 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Este meio foi recoberto com 300 µL de óleo mineral e por fim, gaseificado o ambiente interno do criotubo (Uniscience, São Paulo, Brasil) com uma mistura de 5% de CO₂ e submetidos os mesmos ao transporte em incubadora portátil (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) a uma temperatura de 38,5°C.

Os oócitos foram transportados de carro até o aeroporto mais próximo e então remetidos de avião para o laboratório no estado de São Paulo. O transporte durou entre 18 e 24 horas e após chegar ao laboratório, já em processo de maturação, foram transferidos para placas de Petri (Vitrocell, Campinas, Brasil), em microgotas de 100 µL de meio de maturação semelhante ao usado no transporte até completarem o período de 24 horas de maturação, a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Percorrido o tempo de maturação, foram transferidos para microgotas de 100 µL de meio de fecundação Tyrode modificado (TALP) suplementado com 10 µg/mL de heparina e 160 µL/mL de solução de epinefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para a fertilização foi utilizado sêmen criopreservado comercializado de 12 touros diferentes da raça Nelore. A depender do acasalamento sugerido pelos

proprietários das doadoras, os oócitos maturados foram direcionados para fertilização com espermatozoides provenientes de sêmen convencional (grupo 1 – CONV) ou sêmen sexado para fêmea (grupo 2 – SEX). Em ambos os grupos, o sêmen foi separado em gradiente de Percoll 90 e 45% (4 mL), submetido a uma força de centrifugação de 200g durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet recuperado foi avaliado e ajustado de modo a obter a concentração final de 2 X 10⁶ espermatozoides viáveis/mL. Posteriormente, foram incubados por 18 horas a 39°C em atmosfera de 5% em ar, para a fecundação.

Após o tempo de fecundação, as estruturas foram lavadas por três vezes e transferidas para microgotas de 100 µL de meio de cultivo (Synthetic Oviduct Fluid) SOF modificado, contendo 8 mg/mL de BSA e 1mM de glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) recobertas com óleo mineral. O meio de cultivo foi renovado em cada microgota no terceiro e no quinto dia (feeding), permanecendo nestas por um período de seis dias. Os embriões produzidos foram transportados de volta à Bahia, fazendo o mesmo percurso dos oócitos, para serem transferidos as receptoras.

O transporte dos embriões ocorreu em condições semelhantes às dos oócitos, entretanto, em meio de cultivo embrionário. Devido à logística dos percursos foram feitos cálculos do tempo gasto com o transporte (em média 18 a 24 horas) de forma que os embriões retornavam no dia seis (D0 - dia da FIV) e foram inovulados entre o dia seis e sete. Ao fim do transporte, os embriões (blastocistos e blastocistos expandidos) foram novamente avaliados e envasados em palhetas de 0,25 mL e transferidos as receptoras.

As receptoras utilizadas foram submetidas a um protocolo de transferência de embrião em tempo fixo, onde no dia 0, receberam um dispositivo

intravaginal de progesterona (MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil) associado a 2 mg de Benzoato de Estradiol i.m. (MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil). No dia 8, os dispositivos foram retirados e foram aplicados 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina i.m. (eCG, MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil), 500 µg de Cloprostenol i.m. (MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil) e 1 mg de Cipionato de Estradiol i.m. (Pfizer, Guarulhos, Brasil). O dia 10 foi considerado como o dia do estro e os embriões foram transferidos no dia 17 do protocolo. Anteriormente a cada inovulação, os mesmos procedimentos referentes a limpeza, assepsia e anestesia realizados nas doadoras, foram conferidos às receptoras. Também foram realizados exames dos ovários por ultrassonografia (ALOKA SSD 500, Aloka, Japão) para confirmar a presença e o tamanho do corpo lúteo (CL), sendo que apenas receptoras com CL maior que 13 mm receberam embrião.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal, 30 dias após a data da FIV e repetido com 60 dias utilizando transdutor linear de 5,0MHz (ALOKA SSD 500, Aloka, Japão) quando também foi realizada a sexagem fetal. O sexo do feto foi determinado pela localização do tubérculo genital, o qual, neste período migra em direção ao cordão umbilical no macho e em direção à cauda na fêmea (GREGORY *et al.*, 1995). Todos os exames ultrassonográficos foram realizados pelo mesmo médico veterinário com experiência em diagnóstico de gestação e identificação do sexo fetal. Foi considerado diagnóstico de gestação positivo a presença de uma vesícula embrionária com viabilidade confirmada (batimento cardíaco). A taxa de gestação foi calculada dividindo o total de receptoras gestantes pelo total de vacas que receberam embrião.

Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19). Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises: 1- A média e o desvio padrão das características de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As taxas de gestação entre os grupos CONV e SEX foi verificada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). 3- A ocorrência de desvio na proporção em cada grupo com relação ao esperado foi verificada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) para proporção 1:1. Os testes foram realizados considerando um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1.319 embriões produzidos *in vitro* foram transferidos para receptoras mestiças *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*. Deste total, 1.081 embriões foram produzidos a partir da FIV com espermatozoides provenientes de sêmen convencional (grupo 1 – CONV) e 238 embriões foram produzidos a partir de espermatozoides provenientes de sêmen sexado (grupo 2 – SEX). A taxa de gestação total foi 37,38% (493/1.319), sendo 37,74% (408/1.081) no grupo CONV e 35,71% (85/238) no grupo SEX (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de concepção de receptoras inovuladas com embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando sêmen convencional (CONV) ou sexado de fêmea (SEX).

TRATAMENTOS	Embriões transferidos	Taxa de concepção (%)
CONV	1.081	37,74 (408/1.081)
SEX	238	35,71 (85/238)
TOTAL	1.319	37,38 (493/1.319)

No que diz respeito à proporção do sexo (Tabela 2), no grupo CONV foi verificado um desvio ($P=0,002$) na proporção do sexo a favor dos machos

(57,84% de machos e 42,16% de fêmeas) e no grupo SEX, como já era esperado, ocorreu um desvio ($P=0,001$) a favor das fêmeas (68,24% de fêmeas e 31,76% de machos), entretanto, houve uma proporção considerável de machos neste grupo.

Tabela 2 - Proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando sêmen convencional (CONV) ou sexado de fêmea (SEX).

TRATAMENTOS	N	Machos (%)	Fêmeas (%)
CONV	408	57,84 (236/408)A,c	42,16 (172/408)A,d
SEX	85	31,76 (27/85)B,c	68,24 (58/85)B,d
TOTAL	493	53,35 (263/493)	46,65 (230/493)

Valores seguidos de letras maiúscula distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ($P=0,001$)
Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ($P=0,002$).

DISCUSSÃO

Alguns estudos têm relatado que embriões bovinos produzidos *in vitro* tendem a ser predominantemente do sexo masculino, quando os espermatozoides utilizados na FIV provêm de sêmen convencional (DOMINKO e FIRST, 1997). Entretanto, outros trabalhos nas mesmas condições, não mostraram diferença significativa na proporção do sexo em relação a esperada de 1:1 (GILARDI *et al.*, 2002). Os resultados deste trabalho demonstraram que a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir da fertilização com espermatozoides provenientes de sêmen convencional foi desviada ($P = 0,002$) a favor dos embriões do sexo masculino (57,84% de machos e 42,16% de fêmeas), concordando com os resultados obtidos por Alonso (2008) que ao avaliar a proporção do sexo de 4.650 embriões bovinos produzidos *in vitro* por cinco laboratórios diferentes, também evidenciou desvio significativo do sexo a favor dos machos (52,9% de machos e 47,1% de fêmeas).

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Guitérrez-Ádan *et al.* (2001b) verificaram a proporção do sexo de embriões bovinos oriundos da PIVE e encontraram maior porcentagem de machos (76,3% de machos e 23,7% de fêmeas), sendo que em embriões produzidos *in vivo* com o mesmo sêmen utilizado na PIVE a proporção não diferiu da esperada de 1:1. Dentro deste contexto Hasler *et al.* (2002) aplicando a sexagem comercial de embriões bovinos produzidos *in vitro* em larga escala obtiveram diferença significativa na proporção do sexo com taxa de 53,0% de embriões machos quando um total de 1.181 embriões foram submetidos ao processo de sexagem.

Em divergência aos resultados desta pesquisa Rheingantz *et al.* (2004) não encontraram diferença na proporção do sexo de embriões produzidos *in vitro* (52,0% de machos e 48,0% de fêmeas), entretanto, encontraram diferença na velocidade de desenvolvimento entre os embriões de sexo diferentes. No mesmo dia de cultivo foi observada uma maior porcentagem (74,2%) de machos com estágio mais adiantado de desenvolvimento (oito células) no grupo experimental onde o meio de cultivo era suplementado com glicose, sugerindo que os componentes do cultivo *in vitro* podem influenciar na velocidade de desenvolvimento dos embriões a depender do sexo.

Gilardi *et al.* (2002, 2004) também não encontraram diferença significativa na proporção do sexo em embriões bovinos PIVE (44,3% de machos: 55,7% de fêmeas e 47,6% de machos: 52,4% de fêmeas, respectivamente).

Segundo Kochhar *et al.* (2003), os mecanismos básicos que explicam o desvio na proporção do sexo de embriões produzidos *in vitro* não estão totalmente compreendidos. Os trabalhos que buscam explicar a distribuição desigual de embriões bovinos machos e fêmeas envolvem fatores que favorecem

espermatozoides portadores do cromossomo Y em relação aos portadores do cromossomo X no momento da FIV, suporte preferencial para o desenvolvimento pós-fertilização de conceitos XY ou maior vantagem de embriões machos sobre as fêmeas durante as condições *in vitro*.

Os resultados apresentados por Gutiérrez-Ádan *et al.* (2001a) demonstraram que embriões do sexo masculino desenvolveram mais rápido que os do sexo feminino durante os oito dias após a FIV, levando a uma maior proporção de machos assim como nos resultados aqui encontrados. Os autores sugerem que os embriões do sexo feminino são mais susceptíveis as condições inadequadas *in vitro* principalmente devido a expressão desequilibrada de genes ligados ao cromossomo X, como por exemplo, a expressão de enzimas HPRT, que estão envolvidas no controle de radicais de oxigênio, mas também tem um efeito estimulante no crescimento dos embriões ou enzimas envolvidas no metabolismo energético como a G6PDH.

O sêmen sexado para fêmea foi utilizado neste experimento, como uma alternativa para diminuir a proporção de machos nos produtos oriundos da PIVE. Os resultados encontrados mostraram que a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir da fertilização com espermatozoides provenientes de sêmen sexado para fêmea foi desviada ($P = 0,001$) a favor da fêmeas (68,24% de fêmeas e 31,76% de machos), entretanto, um alto índice de machos ainda permaneceu neste grupo.

Os resultados da presente pesquisa estão em desacordo com os verificados por Wheeler *et al.* (2006) que ao utilizarem as tecnologias combinadas de sêmen sexado e PIVE em vacas holandesas obtiveram 95% dos produtos fêmeas e taxa de gestação em torno de 29,1%, sugerindo que estas tecnologias podem ser utilizadas com êxito em

programas de melhoramento genético animal.

Os achados de Blondin *et al.* (2009) também divergem dos encontrados neste experimento onde 92% dos embriões produzidos com sêmen sexado foram fêmeas, indicando a elevada proporção de espermatozoides portadores do cromossomo X no sêmen sexado, entretanto os autores chamam a atenção para a variação entre touros diferentes, o que pode comprometer o resultado final da PIVE.

De acordo com Wheeler *et al.* (2006), entre as questões que parecem influenciar o sucesso da utilização de sêmen sexado para a produção *in vitro* de embriões estão: diminuição na taxa de fertilização, menor produção de blastocistos e variação entre touros. Uma considerável proporção de machos (31,76%) foi encontrada neste experimento podendo ter sido consequência da variação dos touros utilizados, uma vez que esta questão não foi avaliada no presente trabalho.

O efeito do touro na proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* com sêmen convencional foi observado por Alomar *et al.* (2007). Estes autores compararam a proporção do sexo de embriões provenientes da PIVE produzidos a partir de sêmen de quatro touros diferentes e observaram que em apenas um touro houve desvio na proporção do sexo a favor dos machos (76% de machos e 24% de fêmeas), enquanto os outros não diferiram do esperado de 50%. Estas observações foram realizadas em embriões no estágio de duas células, não sendo assim influenciadas pelas condições de cultivo *in vitro*. Fato que não foi observado neste trabalho.

Dados apresentados por Seneda *et al.* (2006) demonstraram os resultados obtidos por um laboratório comercial no ano de 2004 e 2005 em relação a proporção do sexo de embriões bovinos

produzidos *in vitro* com o uso de sêmen sexado para fêmea. De acordo com estes dados a proporção de fêmeas variou entre 72% até 100% a depender do touro utilizado, sugerindo que mesmo com o uso do sêmen sexado, a depender do touro ainda pode haver um grande número de produtos do sexo oposto ao do sêmen utilizado, concordando com os achados deste experimento.

CONCLUSÃO

A proporção do sexo, neste experimento, foi desviada a favor dos machos quando utilizados espermatozoides provenientes de sêmen convencional na fertilização *in vitro*. O uso de sêmen sexado para fêmea levou a uma maior porcentagem de produtos deste sexo, entretanto uma taxa considerável de machos ainda foi observada com a utilização deste tipo de sêmen.

REFERÊNCIAS

- ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportação de Carne Bovina do Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/41_exportacao_ano.a_sp>. Acesso em: 05 Mar. 2014.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S. *et al.* Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.1, p.48-61, 2007.
- ALONSO, R. V. **Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro em programa de sexagem comercial**. 2008. Araçatuba, 59f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOUNIER, V. *et al.* Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v.71, p.30-38, 2009.
- DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. **Theriogenology**, v.47, p.1041-1050, 1997.
- GILARDI, S. G. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. *et al.* Efeito da adição do soro fetal bovino 48-52h após início do cultivo sobre o desenvolvimento e sexo de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.159-161, 2002.
- GILARDI, S. G. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. *et al.* Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.623-627, 2004.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C. *et al.* Biotecnologias da reprodução animal Produção *in vitro* de embriões. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**. v.11, p.135-138, 2008.
- GREGORY, R. M.; CARDOSO, L.; MATTOS, R. C. Sexagem dos fetos bovinos através da ultrasonografia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.412.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; GRANADOS, J.; PINTADO, B. *et al.* Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v.13, p.361–365, 2001a
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. *et al.* Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117-1126, 2001b.
- HASLER, J. F.; CARDEY, E.; STOKES, J. E. *et al.* Nonelectrophoretic PCR- sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v.58, n.2, p.1457-1469, 2002
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.219-228, 2007.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção pecuária municipal, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=241&id_pagina=1>. Acesso em: 10 Mar. 2014
- KOCHHAR, H. S.; KOCHHAR, K. P.; BASRUR, P. K. *et al.* Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex

- distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.33–49, 2003.
- LONERGAN, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos - Lidando com problemas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.349-360, 2008.
- MAPLETOFT, R. J.; History and perspectives on bovine embryo transfer. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.168-173, 2013
- MEIRELLES, F. V.; MERIGUE, G. K. F.; SANTOS-BIASE, K. *et al.* Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2008. p.195-205.
- RHEINGANTZ, M. G. T.; PEGORARO, L. M. C.; DELLAGOSTIN, O. A. *et al.* Proporção macho: fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por Swim-up ou Gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.32-39, 2004.
- RUFINO, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Determinação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de métodos com ênfase para a PCR. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.1-7, 2006.
- SENEDA, M. M.; SANTOS G. M. G.; SILVA K. C. F. *et al.* Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2006. p.172-180
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.915-924, 2007.
- WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R. *et al.* Aspecto comercial de embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO J. R.; FREITAS V. J. D. E. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.293-301.
- WHEELER, M. B.; RUTLEDGE, J. J.; FISCHER-BROWN, A. *et al.* Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.219-227, 2006.
- XU, J.; CHAUBAL, S. A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v.71, p.39-47, 2009.