

Avaliação da Produção de Embriões Bovinos Utilizando o Sêmen Sexado e Convencional

Jennifer Teodoro Ferreira Gregianini¹, José Marques Carneiro Junior², Helton Aparecido Garcia Gregianini³, Antônia Kaylyanne Pinheiro⁴ e Rafael Carneiro Ranucci⁵

¹Biomédica, mestranda em Sanidade e Produção Animal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

²Zootecnista, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³Médico-veterinário, doutorando em Sanidade e Produção Animal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

⁴Bióloga, doutoranda em Sanidade e Produção Animal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

⁵Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da utilização de sêmen convencional e sexado e diferentes protocolos na produção in vitro de embriões no Acre. Foram utilizados dados de aspiração de 3.542 vacas, entre 2013 e 2016, fornecidos pela empresa In Vitro Acre. As etapas de produção in vitro de embriões, maturação in vivo, fertilização e cultivo in vitro foram realizadas no laboratório. A comparação da eficiência na clivagem e produção de embriões foi realizada por meio do uso de sêmen convencional e sexado. Avaliou-se ainda o efeito do tipo de protocolo Percoll 90%, Percoll 75% e Lavagem. Foram analisadas as variáveis número de oócitos clivados por vaca, número de embriões produzidos por vaca, porcentagem de embriões produzidos por cultivo in vivo, porcentagem de embriões produzidos por oócitos viáveis e porcentagem de embriões produzidos por oócitos clivados. Foi realizado o PROC GLM do SAS para verificação de diferenças significativas seguido pelo teste de Tukey quando necessário. Verificou-se que a utilização do sêmen sexado conduziu à menor eficiência no processo de produção de embriões, sendo significativas todas as diferenças entre as médias das variáveis em estudo. Observou-se superioridade dos métodos Percoll 90% e Lavagem em relação ao método Percoll 75%. Concluiu-se que a produção in vitro de embriões é maior quando se utiliza sêmen convencional comparado ao sexado; e os métodos Percoll 90% e Lavagem conduziram à maior eficiência em relação ao método Percoll 75%, entretanto, esse fato se deve à menor eficiência do sêmen sexado.

Termos para indexação: maturação in vitro, fertilização in vitro, cultivo in vitro.

Introdução

A sexagem espermática permite rápido progresso genético, alta produtividade, melhora o bem-estar dos animais ao evitar castrações e reduz o impacto ambiental por restringir o nascimento de animais de sexo indesejado. Entretanto, para que a técnica de sexagem possa ser extensivamente aplicada é necessário que seja barata, eficaz e eficiente. Dessa forma, essa tecnologia, aliada à transferência de embriões e a programas de melhoramento genético, pode aumentar a rentabilidade da produção nacional de carne e leite (Pontes et al., 2010).

A principal vantagem do uso de sêmen convencional na produção in vitro é obter uma quantidade relativamente maior de embriões tanto de fêmeas como de machos, procurando-se a reposição com animais de qualidade genética. Já o uso do sêmen sexado na produção in vitro é mais desenvolvido para a aquisição de animais específicos, como por exemplo, na raça Girolando destinada ao leite, ou seja, o produtor tem a possibilidade de escolher o sexo e a raça do animal, sendo de grande importância para a indústria de laticínio, corte e produção de touros para repasse.

Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar as alterações genéticas e epigenéticas decorrentes do uso do sêmen sexado na produção de embriões bovinos in vitro (Araújo et al., 2013). Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar a eficiência da utilização de sêmen convencional e sêmen sexado e diferentes protocolos na produção in vitro de embriões bovinos, no estado do Acre.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado com dados de aspiração de 3.542 vacas das raças Nelore, Brahma e Senepol da empresa In Vitro Acre, especializada em reprodução bovina, localizada em Rio Branco, entre os anos de 2013 e 2016.

A fertilização in vitro (FIV) foi realizada após 24 horas de maturação dos oócitos em incubadora a 38,5 °C a 5% CO₂. Para realização da FIV utilizam-se dois principais protocolos: um para o sêmen convencional (Percoll 90%) e outro para sêmen sexado (Percoll 75%). A diferença entre eles está na preparação de cada método, sendo o Percoll 90% mais concentrado. Após a preparação e o aquecimento do meio de FIV com PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina), heparina e antibiótico, nas suas respectivas medidas, é feita a fecundação, realizando o descongelamento da dose de sêmen em 39 °C para sêmen sexado e 36 °C para sêmen convencional, e em seguida a centrifugação. Para o protocolo de sêmen sexado a primeira rotação é feita a 10.000 rpm por 5 minutos e a segunda a 4.000 rpm por 3 minutos e, para sêmen convencional, a primeira rodada a 9.000 rpm por 5 minutos e a segunda a 1.000 rpm por 3 minutos.

Sabendo-se do processo de citometria de fluxo, procedimento necessário para a sexagem do sêmen, pode-se observar que após a centrifugação o Pellet de sêmen sexado é menos concentrado em espermatozoides que o de sêmen convencional, devido aos procedimentos para a sexagem.

Foi realizada comparação da eficiência na clivagem e produção de embriões por meio do uso de sêmen convencional e sêmen sexado, avaliou-se ainda o efeito do tipo de protocolo Percoll 90%, Percoll 75% e Lavagem.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de oócitos clivados por aspiração, porcentagem de embriões formados por cultivo in vivo, porcentagem de embriões formados por oócitos viáveis, porcentagem de embriões formados por oócitos clivados e total de embriões formados por vaca.

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva que constou de análise de variância pelo método de quadrados mínimos generalizados, utilizando-se o General Linear Models Procedure – PROC GLM – do Statistical Analysis System – SAS (SAS Institute, 2002), e quando necessário procedeu-se à aplicação do teste de média de Tukey ao nível de 1% de significância.

Resultados e discussão

Para todas as variáveis avaliadas a utilização do sêmen sexado conduziu à menor eficiência no processo de produção de embriões, sendo todas as diferenças observadas entre as médias significativas ($p < 0,01$). Em relação ao número de embriões produzidos por vaca, verifica-se, por exemplo, uma diferença de quase três embriões (Tabela 1). Segundo Schenk et al. (1999), durante o processo de separação do espermatozoide, a célula espermática é exposta a vários tipos de estresses (mecânicos e químicos) que podem lhe causar danos, o que resulta na baixa taxa de desenvolvimento embrionário na produção in vitro, comparando-se com a utilização do sêmen convencional.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão (DP) para número de oócitos clivados por vaca (NOCV), número de embriões produzidos por vaca (NEPV), porcentagem de embriões produzidos por cultivo in vivo (PEPCIV), porcentagem de embriões produzidos por oócitos viáveis (PEPOV), porcentagem de embriões produzidos por oócitos clivados (PEPOC) com a utilização de sêmen convencional e sexado.

Variável	Convencional		Sexado	
	$\bar{X} \pm DP$	Mín. – Máx.	$\bar{X} \pm DP$	Mín. – Máx.
NOCV*	18,70 \pm 13,47	0–134	12,40 \pm 6,91	0,5–31,7
NEPV*	7,50 \pm 6,11	0–55	4,37 \pm 3,57	0–20
PEPCIV*	29,52 \pm 17,77	0–100	22,34 \pm 14,18	0–100
PEPOV*	37,14 \pm 29,56	0–100	28,90 \pm 18,18	0–100
PEPOC*	32,35 \pm 18,61	0–100	23,68 \pm 14,16	0–100

*Significativo a 5% de probabilidade.

A utilização do sêmen sexado parte da premissa de que é necessário um pequeno número de espermatozoides para fertilização do oócito (Lu et al., 1999). Entretanto, segundo Sartori et al. (2004), o número de espermatozoides presentes na zona pelúcida de oócitos degenerados e não fertilizados é maior com a utilização do sêmen não sexado, indicando que muitas vezes a quantidade de espermatozoides é insuficiente para fertilizar os oócitos. Observa-se ainda na Tabela 1 que a utilização do sêmen sexado, apesar das vantagens, requer maior número de oócitos aspirados, uma vez que a média do número de oócitos clivados por vaca (12,40) é significativamente menor do que quando se utiliza sêmen convencional (18,70). Devido à melhor motilidade e concentração do sêmen convencional o índice de produção de embriões in vitro referente à quantidade de oócitos maturados é superior em relação ao sêmen sexado que possui uma menor concentração de espermatozoides (Beltrame, 2010).

Segundo Murta et al. (2013), o sêmen sexado é composto por baixa concentração espermática. Esse menor número de espermatozoide por dose de sêmen sexado causa uma perda de fertilidade comparando-se com a utilização do sêmen convencional. Devido à menor produção de embriões com o sêmen sexado, é necessária uma maior quantidade de oócitos para maturação e posterior fecundação, com objetivo de não prejudicar a logística no campo, devido à quantidade de receptoras sincronizadas (Dell'Aqua Júnior et al., 2006).

Contudo, apesar da menor eficiência observada com a utilização do sêmen sexado frisa-se que as vantagens podem compensar as perdas observadas no processo de produção de embriões. A utilização do sêmen sexado na produção in vitro de embriões permite reduzir o tempo de melhoramento e aumentar o ganho genético por geração em até 15% quando comparada ao sêmen convencional, dependendo do sistema de produção adotado (Oses et al., 2009; Tanno, 2009). Além disso, o uso do sêmen sexado tem como vantagem a obtenção de um produto desejado sem o desperdício de se adquirir embriões que não supram a necessidade.

Na Tabela 2 é possível observar os resultados para diferentes protocolos utilizados na produção in vitro de embriões. O método Percoll 90% é utilizado para o emprego do sêmen convencional e o método Percoll 75% para o sêmen sexado. Já o método Lavagem tem sido mais empregado para produção in vitro de embriões da raça Senepol, também para sêmen convencional. Observa-se, dessa forma, geralmente superioridade dos métodos Percoll 90% e Lavagem em relação ao método Percoll 75%. Para as variáveis NOCV, NEPV e PEPCIV os métodos Percoll 90% e Lavagem foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,001$) e diferentes do método Percoll 75% ($p < 0,001$). Esses resultados podem ser explicados devido ao estresse sofrido pelo espermatozoide durante o processo de separação, e também pelo processo de congelamento. Para as variáveis PEPOV e PEPOC não foram observadas diferenças estatísticas entre os métodos.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (DP) para número de oócitos clivados por vaca (NOCV), número de embriões produzidos por vaca (NEPV), porcentagem de embriões produzidos por cultivo in vivo (PEPCIV), porcentagem de embriões produzidos por oócitos viáveis (PEPOV), porcentagem de embriões produzidos por oócitos clivados (PEPOC) de acordo com o método.

Variável	Percoll 90%	Percoll 75%	Lavagem
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
NOCV	18,65 ± 13,11 A	11,95 ± 6,38 B	19,69 ± 18,88 A
NEPV	7,46 ± 5,91 A	4,26 ± 3,59 B	7,80 ± 9,20 A
PEPCIV	29,66 ± 17,80 A	22,18 ± 14,58 B	24,85 ± 15,02 B
PEPOV	37,38 ± 29,80 A	28,17 ± 17,80 A	31,38 ± 20,36 A
PEPOC	41,87 ± 23,82 A	36,23 ± 20,66 A	39,72 ± 21,79 A

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,001$).

Neste estudo o método Percoll 90% foi mais empregado ($n = 804$) em relação aos métodos Percoll 75% ($n = 90$) e Lavagem ($n = 39$). Isso ocorreu pelo fato do método Percoll 90% ser utilizado para sêmen convencional e o Percoll 75% para sêmen sexado, já o método Lavagem é mais empregado para produção de embriões na raça Senepol.

Conclusões

Conclui-se que a produção in vitro de embriões é maior com o uso de sêmen convencional quando comparada ao uso do sêmen sexado.

Os métodos Percoll 90% e Lavagem conduzem à maior eficiência na produção de embriões em relação ao método Percoll 75%, entretanto, esse fato ocorre devido à menor eficiência do sêmen sexado.

Referências

- ARAÚJO, M. S.; VOLPATO, R.; LOPES, M. D. Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 3, p. 8-15, dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v11i3.17370>.
- BELTRAME, R. T. Análise de embrião na fertilização in vitro e transferência de embrião para doadoras nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 17-23, jan./mar. 2010. DOI: 10.5216/cab.v11i1.4521.
- DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; FREITAS, C. P.; PONCHIROLLI, C. B.; FIGUEIREDO, A. S.; MELO, C. M.; ALBERTI, K.; CREPILHO, A. M.; SIQUEIRA FILHO, E. R.; ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 205-202, 2006. Suplemento. Edição do XX Annual Conference Of the SBTE. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/34-suple/anais%20sbte2006%20final.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL JUNIOR, G. E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1393-1405, Dec. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00225-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00225-3).
- MURTA, D. V. F.; GOMES, V. C. L.; MARTINEZ, L. C. R. Uso de sêmen sexado em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 20, p. 1-16, 2013.

OSES, M. V.; TERUAL, M. T.; CABODEVILA, J. A. Utilización de semen bovino sexado em inseminación artificial, transferencia embrionária y fertilización in vitro. **Revista Veterinaria**, v. 20, n. 2, p. 138-145, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2021867>.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCINATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicustaurus dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>.

TANNO, P. H. **Estudo das alterações morfo funcionais de espermatozóides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; WILBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86-90, Oct./Dec. 2004.

SAS Institute. **User's guide**: statistics. Cary, NC, 2002. 525 p.

SCHENK, J. L.; SUN, T. K.; CRAN, D. G.; SEIDEL JÚNIOR, G. E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1375-1391, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00224-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00224-1).