



# SEXAGEM DE EMBRIÕES BOVINOS

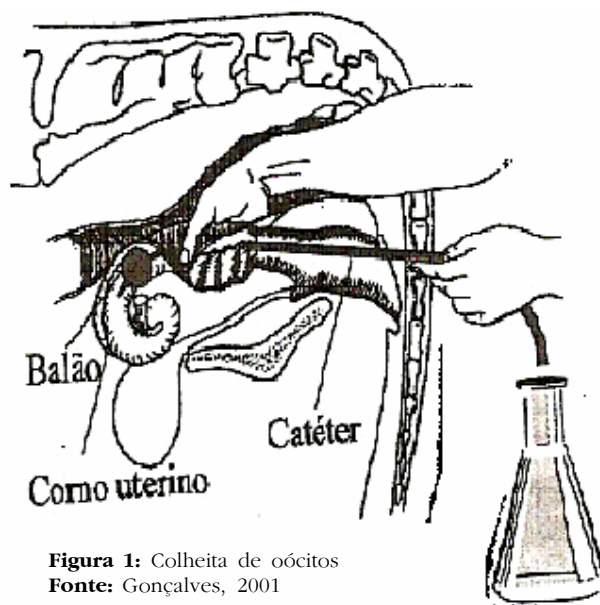
Atualidades sobre a aplicação da técnica de Sexagem aliada ao PCR (Polymerase Chain Reaction), desde o campo até a comercialização de embriões sexados.

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

A sexagem de embriões por análise de DNA, agregada à produção *in vitro*, constituem ferramentas importantes que permitem intensificar e acelerar o melhoramento genético de animais de alto valor zootécnico. Através destas tecnologias o criador pode escolher o sexo desejado ainda na fase embrionária,

estudadas há mais de 25 anos e a reação em cadeia da polimerase (PCR) reproduz artificialmente a forma como o DNA é replicado na natureza (HASLER et al, 2002). Apresentada à comunidade científica em 1984, a PCR foi adotada como uma ferramenta de pesquisa essencial dado à potencialidade de utilização na área de biologia molecular (OLIVEIRA; HENKES, 2002).

A sexagem de Embriões Bovinos pela técnica de PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) é uma biotecnologia relacionada à transferência de embriões (REICHENBACH et al., 2001), que contribui diretamente na otimização da eficiência reprodutiva para a melhora da performance produtiva e da lucratividade dos rebanhos bovinos (SCARCELLI et al, 2004).



**Figura 1:** Colheita de oócitos  
**Fonte:** Gonçalves, 2001

## COLHEITA DE OÓCITOS

O primeiro passo é a colheita *in vitro* de oócitos, geralmente é efetuada por punção folicular, utilizando agulha acoplada a uma seringa ou bomba a vácuo, guiada por ultrasonografia transvaginal (GONÇALVES et al., 2002), este método de colheita por ser não-cirúrgico tem mostrado praticidade na utilização repetida da mesma doadora (HAFEZ, 1995).

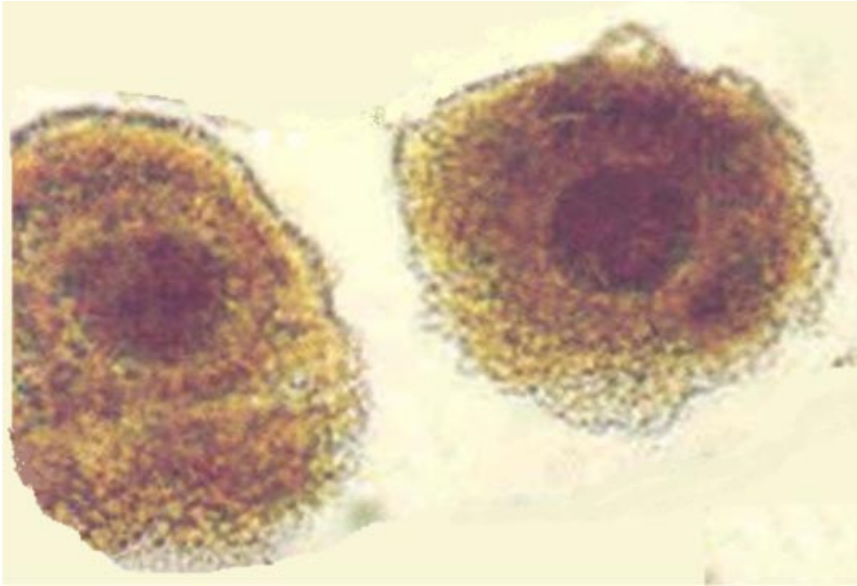
A punção folicular transvaginal contribui para reduzir o intervalo entre gerações, para acelerar o melhoramento genético, bem como pode ser repetida em várias oportunidades num mesmo animal sem prejuízo de sua capacidade reprodutiva

diminuindo custos com receptoras, tratamentos hormonais para sincronização, manejo e locação de espaço na propriedade. O Brasil tem se destacado como um dos países que mais aplica comercialmente e em larga escala as diversas biotecnologias utilizadas na reprodução animal.

As técnicas para a determinação do sexo em embriões bovinos têm sido

**PAOLA GOMES PASSAGLIA** – BIÓLOGA  
– CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE  
UBERABA – [paolapassaglia@hotmail.com](mailto:paolapassaglia@hotmail.com)

**ANTONIO HAMILTON CHAVES** –  
DOUTOR EM ZOOTECNIA – PROFESSOR  
DO CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO  
TECNOLÓGICA DE UBERABA  
[abchaves@terra.com.br](mailto:abchaves@terra.com.br)



**Figura 2: oócito maturado**

Fonte: Folheto de divulgação do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2006

(PIETERSE et al., 1991).

Com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais, ocorreu um grande avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse para a produção animal.

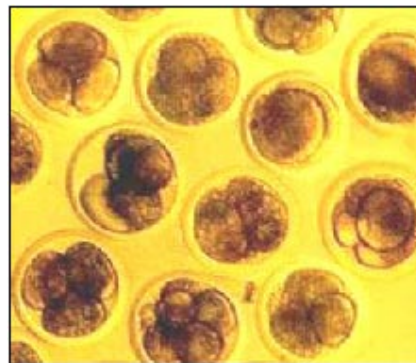
A aspiração de ovócitos imaturos por punção folicular, associada à maturação e fecundação "in vitro" dos mesmos, e ao cultivo "in vitro" dos embriões, permite que sejam produzidas, em média, 36 crias/ano de uma única fêmea. (RUMPF, 2006).

### **MATURAÇÃO *IN VITRO***

A maturação dos oócitos (Figura 2), envolve as transformações nuclear e citoplasmática, e está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente. O oócito presente no folículo primordial, uma vez ativado, deve crescer e sofrer várias modificações de ordem ultra-estrutural, citoplasmática e bioquímica com a finalidade de se tornar competente para reiniciar e completar

a maturação (GONÇALVES et al, 2002).

Também é usual a utilização do LH, ou do hormônio folículo estimulante (FSH) ou ainda a combinação dessas gonadotrofinas. A maioria dos resultados publicados demonstra que a adição de gonadotrofinas ao meio de maturação de oócitos bovinos, aumenta a capacidade de fecundação do



**Figura 3: Células (em estágio de clivagem)** de embriões bovinos cultivados .in vitro. - Foto de divulgação do curso de Fecundação in vitro da Universidade Federal de Pelotas, 2006

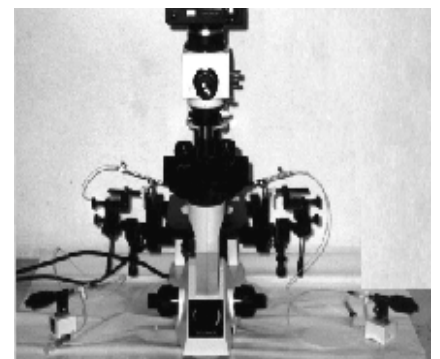
oócito e melhora o posterior desenvolvimento embrionário.

Além do meio, outros fatores relacionados com o ambiente de cultivo celular devem ser considerados como fundamentais. Geralmente, a maturação de oócitos bovino é realizada a 37,8°C por 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (GONÇALVES; 2002).

### **FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

A FIV também é uma técnica fundamental para o uso de todas as novas biotécnicas da reprodução animal, pois através dela é possível produzir embriões pró-sexados e embriões ou zigotos em vários estágios de desenvolvimento, para os estudos de transgênese e clonagem. Recentemente, também tem sido sugerido o uso da FIV para avaliar o potencial reprodutivo de touros, avaliando com mais precisão a fertilidade de um reprodutor (DODE, 2000).

As técnicas mais utilizadas para separação de espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores são o swim up, o gradiente de percoll e o lavado espermático. A técnica ideal para separação espermática deve ser rápida, simples, de baixo custo, capaz de recuperar a maioria dos espermatozoides móveis, não resultar em alterações espermáticas, remover espermatozoides mortos e outras células, incluindo mi-



**Figura 4: Sistema de micro-manipulação** composto por microscópio invertido, 2 microseringas para a aspiração e 2 micromanipuladores mecânicos (GARCIA; UVO, 2002)

croorganismos, remover substâncias tóxicas e bioativas, permitir o processamento de grandes volumes de sêmen, além de permitir o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (GONÇALVES et al., 2002).

A composição química dos meios para o cultivo in vitro de embriões foi determinada pela avaliação de suas necessidades metabólicas. A maioria dos meios consiste de soluções salinas acrescidas de um componente macromolecular, podendo ser preparadas em laboratórios próprios, ou adquiridas comercialmente (MATTOS et al, 1991).

### CULTIVO

O cultivo de células in vitro (Figura 3) requer o uso de substâncias com propriedades especiais como, presença de proteínas, propriedades sulfarcantes e ausência de toxinas, para um bom desenvolvimento celular (SOLANO & PILAR, 1984).

A composição química dos meios para o cultivo in vitro de embriões foi determinada pela avaliação de suas necessidades metabólicas. A maioria dos meios consiste de soluções salinas acrescidas de um componente macromolecular, podendo ser preparadas em laboratórios próprios, ou adquiridas comercialmente (MATTOS et al, 1991).

### MICROASPIRAÇÃO DO DNA (BIÓPSIA)

Para realizar a biópsia de embriões utiliza-se um micromanipulador Leitz (Figura 4). Uma placa é acoplada e montada em um dos lados do micromanipulador. Antes da biópsia, os embriões são individualmente lavados através de três microgotas (100 µl) de proteínalivre PBS em uma placa de petri de 100 mm<sup>2</sup>. Os embriões são aderidos ao fundo da placa de petri e são visualizados a uma amplificação de 100 vezes e alinhados ao centro. Uma pequena porção ideal de 6 a 10 células do blastocisto é removida pelo movimento direto da lâmina (Figura 5), geralmente na borda do embrião. Depois que cada embrião é biopsiado, a lâmina é descartada.

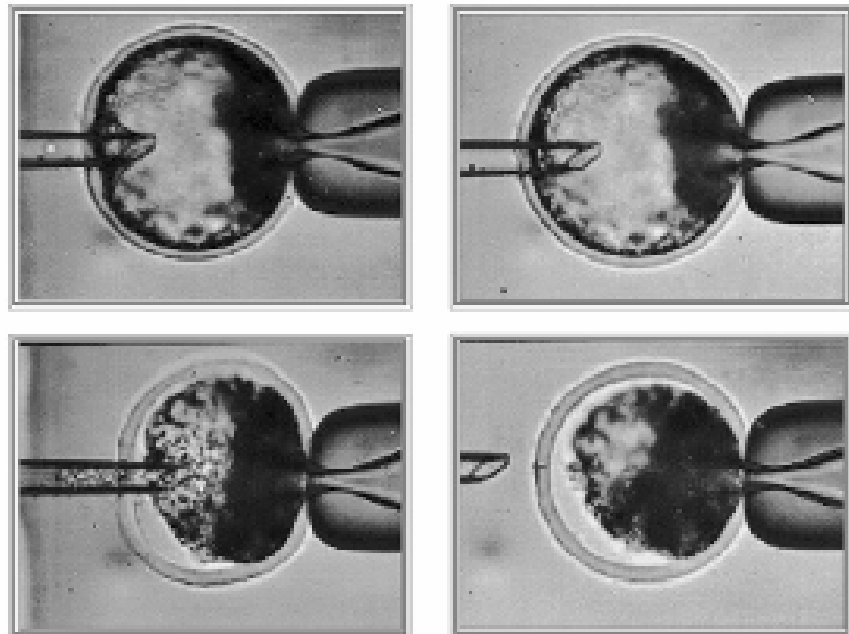


Figura 5: **Etapas do processo de micromanipulação** para a retirada de biópsia embrionária por aspiração (GARCIA; UVO, 2002)

Para facilitar a liberação dos embriões biopsiados do fundo da placa de petri, é adicionado a cada microgota contendo embrião biopsiados, 50µl de Sur-

factant Fluramic a 0,4% ou 50µl de álcool polivinil a 1% (HASLER et al, 2002). Segundo Ardais et al (2005); os embriões geralmente são biopsia-

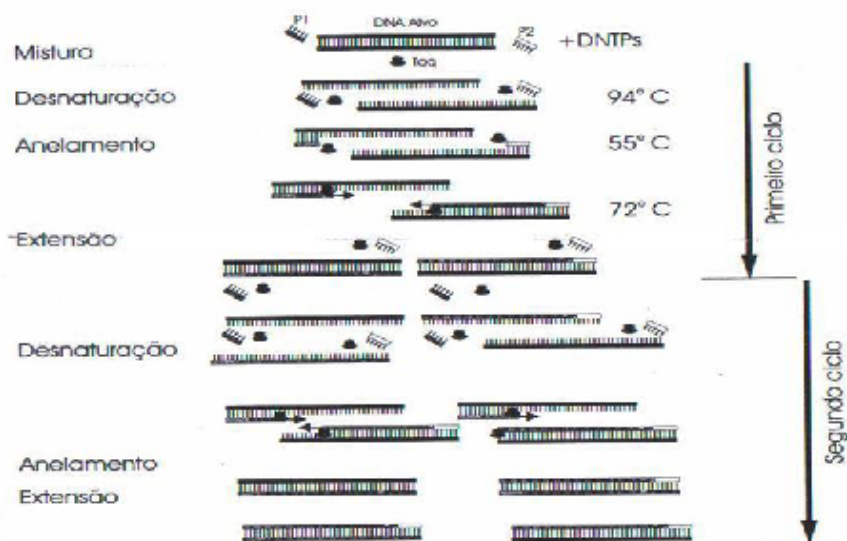


Figura 6. **Diagrama ilustrando** as diferentes etapas durante a amplificação de DNA utilizando a técnica de PCR (OLIVEIRA; HENKES, 2002)

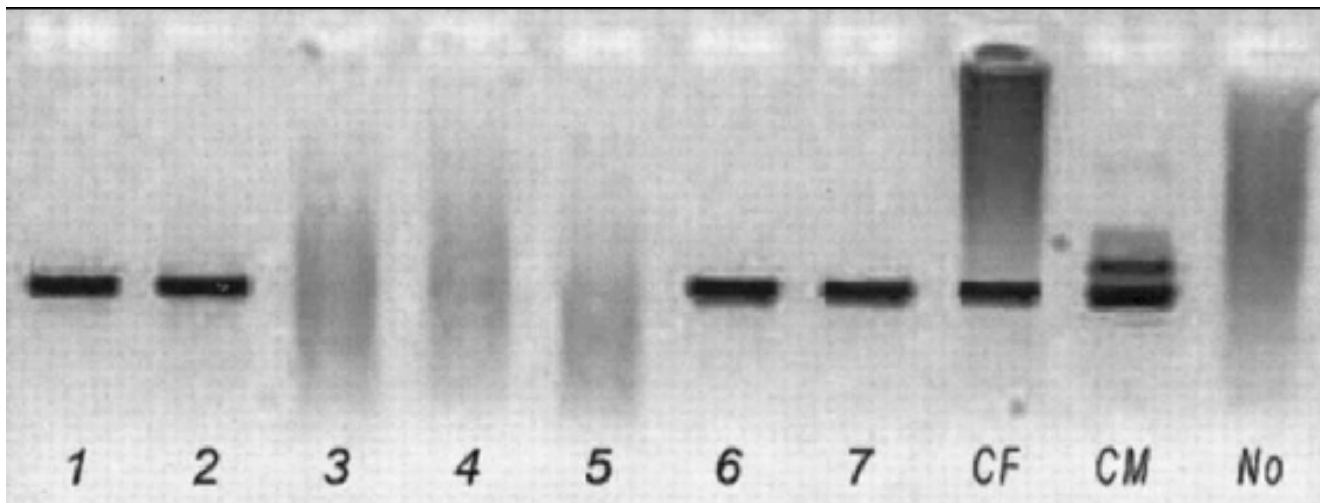


Figura 7: Ilustração de resultado da PCR em biópsia de embriões bovinos com eletroforese em gel de agarose corado com Brometo de Etídio (ALONSO, 2006)

	Nº de Embriões Testados	Resultados Confirmados Por US ou Nascimento	Taxa de Acerto
<b>Embriões analisados como machos</b>	<b>79</b>	<b>74</b>	<b>93.7%</b>
<b>Embriões “presumíveis fêmeas”</b>	<b>31</b>	<b>25</b>	<b>80.5%</b>
<b>Total de embriões biopsiados</b>	<b>110</b>	<b>99</b>	<b>90.0%</b>

Tabela 1: Resultados gerais de sexagem por PCR obtidos entre abril de 1999 e março de 2001, para embriões já transferidos e com resultado de sexagem por ultra-sonografia (GARCIA e UVO, 2002). Nos últimos anos, o Brasil apresentou uma demanda crescente do uso desta tecnologia em animais de genética superior, utilizando a aspiração, a amplificação da região repetitiva Y específica do cromossomo, seguida da eletroforese, protocolos estes recentemente mais utilizados comercialmente (GARCIA e UVO, 2002)

dos no 6º dia de cultivo, mediante microaspiração utilizando um micromanipulador mecânico.

### POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Esta técnica é utilizada para amplificar e detectar DNA específico do cromossomo Y (Fig. 6), presente somente nas células dos embriões do sexo masculino. As células biopsiadas são submetidas à lise com proteinase K, segundo Luz et al (2000); Almodim et al (2005) e Ardais (2005).

O DNA é sintetizado em um ciclo inicial e passa a ser o molde para a síntese posterior de DNA dos ciclos subsequentes. Após aproximadamente 30 ciclos de síntese os produtos de PCR deverão incluir, além do DNA original, aproximadamente 105 cópias da seqüência alvo. A reação envolve ci-

clos seqüenciais completos compreendendo três etapas básicas: desnaturação, anelamento e síntese do DNA (OLIVEIRA e HENKES, 2002) e extensão dos primers. (PEREIRA, 1996).

a) **Desnaturação:** Compreende a dissociação das ligações que mantêm unida a dupla fita de DNA. Isso é obtido tipicamente pela utilização de temperaturas entre 93-95°C;

b) **Anelamento:** Ligações das seqüências iniciadoras com a seqüência alvo. Esse passo normalmente utiliza temperaturas entre 50 e 70°C dependendo da Tm ou temperatura de dissociação (do inglês temperature of melting) calculada. Temperaturas de anelamento mais elevadas aumentam a especificidade da reação.

c) **Síntese do DNA:** A partir dos iniciadores já ligados à seqüência alvo, começa a síntese de uma nova seqüência complementar. As temperaturas

que conferem maior eficiência nessa etapa estão entre 70-75°C (OLIVEIRA e HENKES, 2002).

d) **Extensão dos primers:** Esta etapa é feita a 72°C, que é a temperatura ótima para a enzima Taq DNA polimerase, que durante esta fase utiliza-se dos nucleotídeos incluídos entre os reagentes para a reação de PCR e completa a fita sintetizada, de acordo com a fita original, a partir dos primers. Ao final desta etapa, repetem-se novamente os ciclos por aproximadamente 30 vezes, o que faz com que a seqüência alvo seja amplificada 1 bilhão de vezes (PEREIRA, 1996).

Segundo Oliveira e Henkes (2002), Essa quantidade de material pode ser facilmente visualizada como bandas de tamanho específico quando submetida à

eletroforese em gel de agarose (Figura 7). Ardais (2005), Almodim (2005) e Alonso (2006), ressaltam que, duas bandas representam machos, podendo ser visualizados os cromossomos X e Y, e nas fêmeas apenas a visualização do cromossomo X.

A separação de moléculas de ácidos nucléicos em laboratórios de biologia molecular é realizada com o auxílio da técnica de eletroforese em gel de agarose. Os géis de agarose são, geralmente, corados com soluções de brometo de etídio (EtBr), uma substância intercalante de alta toxicidade e mutagenicidade, que revela os ácidos nucléicos ao fluorescer sob luz ultravioleta (AZEVEDO et al., 2003).

### O USO COMERCIAL DA SEXAGEM DE EMBRIÕES

Todos os setores da indústria do gado derivam do benefício econômico da habilidade de determinar o sexo de embriões antes que a prenhez esteja estabelecida. Os benefícios maximizados pela sexagem de embriões durante a transferência rotineira e superovulação das doadoras, estão sendo realizados agora em uma variedade de aplicações comerciais.

Os embriões sexados podem ser congelados com sucesso, contudo realçando a utilidade comercial do procedimento da biopsia como uma ferramenta rotineira da produção (HEER; REED, 1991). A atual situação econômica da pecuária mundial exige dos produtores máxima eficiência para garantia de retorno econômico. Desta forma, elevados índices de produção, associados à alta eficiência reprodutiva devem se constituir em metas para técnicos e os criadores alcançarem melhor produtividade e satisfatório retorno econômico (SCARCELLI et al, 2004).

Segundo Bredbacka; Kankaanpää; Peippo (1995) e Shea (1999) a sexagem de embriões bovinos baseada na metodologia

de PCR têm se tornado mais comum para fins comerciais, onde se observa uma eficiência (proporção de amostras diagnosticadas) de 90-95% e acurácia de 93-98%, conforme dados coletados por Garcia e Uvo (2002) publicado no jornal o Embrião, da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (Tabela 1).

Nos últimos anos, o Brasil apresentou uma demanda crescente do uso desta tecnologia em animais de genética superior, utilizando a aspiração, a amplificação da região repetitiva Y específica do cromossomo, seguida da eletroforese, protocolos estes recentemente mais utilizados comercialmente (GARCIA e UVO, 2002).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sexagem de embriões bovinos pela técnica de PCR é uma biotécnica, bastante utilizada atualmente; todavia, complexa que requer equipamentos, experiência e habilidade profissional para a sua execução, além disso, é uma técnica que é indicada somente para a produção de crias geneticamente privilegiadas e com alto valor de Mercado.

No Brasil, a sexagem já tem relevância comercial, visto que vários profissionais e empresas de biotecnologia da reprodução oferecem serviços para a realização da sexagem de embriões a nível comercial.

A estreita relação da sexagem e transferência de embriões com a produção animal têm alterado o comércio tradicional de reprodutores, elevando substancialmente o valor das fêmeas geneticamente superiores.

### BIBLIOGRAFIA

1. ALMODIN, C. G. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**, V.84, no 4, p. 895 - 900, 2005.
2. ALONSO, R.V.; WEPPERT, M.; GARCIA, J.F.; REICHENBACH, H.D. Effect of biopsy by peizo-micromanipulation on development capacity of in vitro produced bovine morulae and blastocysts. **Acta Scientiae Veterinari-**

**ae**, v. 31, p. 214-15, 2003.

3. ALONSO, R.V.; HELLÚ, J. A. A.; ARDAIS, D. B.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J.F. Aplicação comercial em larga escala da sexagem de embriões produzidos in vitro por análise de DNA. In: **anais....XX** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Araxá, M.G. 2006, 26 p.

4. ARDAIS, D. B. et al. Sexagem de embriões produzidos in vitro por análise de DNA. In: **anais...** 6o Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas. Uberaba, M.G.: ABCZ, 2005, 352p.

5. AZEVEDO, M. O., FELIPE, M. M. S., BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q., DE SOUZA, M. T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília, DF. Editora UNB, 2003, 211p.

6. BREDBACKA, P., KANKAANPÄÄ, A., PEIPPO, J. PCR . Sexing of bovine embryos: A simplified protocol. **Theriogenology**, v. 44, p. 167-76, 1995.

7. BRUM, D. S., et al. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos in vitro. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v. 39, n. 2, 2002.

8. CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SERAPIÃO, R. V.; RAMOS, A. A.; MACHADO, M. A.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J. Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro e cultivados com células do cumulus na presença de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 407 - 409. 2003.

9. CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PALASZ, A. T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R.J. Survival rates and sex ratio of bovine embryos frozen at different developmental stages on days 7. **Theriogenology**. Vol. 45, pág. 489 - 498, 1996.

10. COELHO, L. A.; ESPER, C. R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA, I. R. ALMEIDA, I. L. Evaluation of oocyte maturation conditions and bull effect on the in vitro bovine embryo production. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v. 35, n. 3, 1998.
11. DODE, M. A. N. **Fecundação in vitro para o melhoramento animal**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.
12. FERNANDES, M.A. **Ácidos nucleicos e biologia molecular**. In: BRACHT, A., ISHIIWAMOTO, L.E. Métodos de laboratório em bioquímica. Barueri, São Paulo. Editora Manole Ltda, 2003; cap. 13, p. 291 . 325.
13. GARCIA, J. F.; UVO, S. Identificação do sexo de embriões . Ficção ou Realidade? **O embrião**, nº 13, p. 13-06, 2002.
14. GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, Cap. 10. p. 195-226.
15. HANDYSIDE, A.H.; PENKETH, R.J.A.; WINSTON, R.M.L. Biopy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, v.18, p. 347-49, 1989.
16. HAFEZ, E. S. E. Tecnologia reprodutiva assistida: manipulação da ovulação, fertilização in vitro / transferência de embrião (FIV/TE). In: **Reprodução animal**. 6 ed. (1ed. Bras.) São Paulo: Manole, 1995, Cap. 23. p. 469 - 512.
17. HASLER, J. F.; CARDEY, E.; STOKES, J. E.; BREDBACKA, P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v. 58, p. 1457-1469, 2002.
18. HEER, C.M.; REED, K.C. Micro-manipulation of bovine embryos for sex determination. **Theriogenology**, v. 35, p.45-5, 1991.
19. LUZ, Marcelo Rezende et al. Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro pela técnica de PCR multiplex. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, 2000.
20. MATTOS, A.L.; POZZER, M.A.; PEREIRA, I.C. et al. Cultivo de embriões Mus musculus em soro humano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.15, p. 199-201, 1991.
21. OLIVEIRA, J. F. C.; HENKES, L. E. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, R. J.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002; Cap. 12. p. 261-279.
22. PEREIRA, J. C. C., **Melhoramento genético aplicado à reprodução animal**. Belo Horizonte, 1996, p. 361-364.
23. PIETERSE, M. C., VOS, P. L. A. M., KRUIP, TH. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, nº 1, p. 19-24, 1991.
24. REICHENBACH, H.D. et al. Transferência e criopreservação de embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo. Livraria Varela, 2001. Cap. 08; p. 127-177.
25. RUMPF, R. Biotecnologia - **Surgeon novas oportunidades em embriologia animal**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.
26. SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; TENÓRIO FILHO, F.; OLIVEIRA, L. R. S.; AZEVEDO, J. B.; LUNES-SOUZA, T. C.; BIANCHINI, S.; DANDA, E. P. N.; CASTRO, V. B. Punção folicular em bovinos guiada por ultra-som utilizando transdutores linear e microconvexo endocavitário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 465-466. 2003.
27. SCARCELLI, E. ; PIATTI, M. R.; CARDOSO, M.V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, R. F.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, E. M. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR . Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 23-27. 2004.
28. SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. **Theriogenology**, 51: 841-854, 1999.
29. SHRÖDER, A.; MILLER, J.R.; THOMSEN, P.D.; ROSCHLAU, K.; AVERY, B.; POUSEN, P.H.; SCHMIDT, M.; SCHEWERIN, M. Sex Determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, v.1, p. 121-33, 1990.
30. SOLANO, R.F.; PILAR, G. Desarrollo de una técnica para la producción de suero fetal bovino en Cuba. **Revista Cubana de Reprodução Animal**, v. 2, p. 95. 1984.
31. WECH, G.R.; JOHNSON, L. A. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. **Theriogenology**, v. 52, n.18, p. 1343-52, 1999.
32. WOUDEMBERG, A. R. C.L. Van. B. **Fundamental aspects of bovine oocyte maturation: The role of estradiol, VIP and GHRH**. Tese de PhD na Proefschrift Universiteit Utrecht. [s.n.], 2004, 130 f.