O SEXO DETERMINADO

Divulgação

Atualmente, há tecnologias disponíveis no mercado que permitem escolher o sexo da cria antes mesmo da produção do embrião. Esse processo chama-se ''sexagem de sêmen'', técnica que vem sendo desenvolvida no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade de São Paulo (USP) desde 1985 e já está disponível pelas principais empresas especializadas em sêmen bovino.

A sexagem de sêmen possui um mercado potencial e atrativo para bovinos, já que o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 196 milhões de cabeças. Além disso, ela é associada a programas como inseminação artificial (IA) ou produção *in vitro* de embriões – ferramentas utilizadas para multiplicação de animais de genética superior.

De acordo com a pesquisadora Vera Hossepian de Lima, integrante do grupo de pesquisa que desenvolveu um dos métodos de sexagem, da Unesp-Jaboticabal/SP, a inseminação artificial em bovinos cresceu 350% nos últimos dez anos e o Brasil é o segundo País, juntamente com o Japão, quanto ao número de transferências de embriões. "Em 2004, foram comercializados 7,5 milhões de doses de sêmen bovino e transferidos mais de 110 mil embriões bovinos produzidos *in vitro* por ano. Esse número representa, em média, 50% dos embriões coletados *in vivo* e transferidos no mundo, que é de aproximadamente 260 mil por ano", destaca a especialista.

O crescimento expressivo da inseminação artificial se deu pelo número crescente de rebanhos submetidos a programas de melhoramento genético e cruzamento industrial e são esses mesmos programas que permitem que, atualmente, as vendas de sêmen se sustentem em patamar de 7,5 milhões de doses por ano (dados da Asbia, 2004). "Além das vantagens zootécnicas, esse mercado crescente e potencial para a IA é o que justifica o grande interesse na sexagem de espermatozóides por parte das empresas especializadas em congelamento de sêmen bovino que operam no Brasil", explica Vera.

Divulgação

Galassi: "escolher o sexo do animal antes de nascer é uma revolução"

"A possibilidade de produzir doses de sêmen enriquecidas com espermatozóides X ou Y, em escala comercial, aumentará os benefícios da utilização da IA, conferindo-lhe um papel decisivo na maximização de melhoramento genético e da aptidão do rebanho", justifica a pesquisadora.

SEM ERRO

Utilizando a inseminação artificial como aliada, a sexagem de sêmen permite a determinação do sexo da cria antes mesmo da produção do embrião. Atualmente, essa tecnologia é aplicada por dois métodos, já disponíveis no mercado brasileiro

Divulgação

Bezerra anelorada nascida de sêmen sexado

Tammy Lauterbach

André Galassi, gerente nacional de negócios da Goyaike Brasil Agropecuária, detentora da tecnologia aplicada no Brasil através do processo de citometria de fluxo, considera que a pecuária brasileira será dividida em duas etapas, antes e depois do sêmen sexado. "Poder escolher o sexo dos bezerros antes de nascerem é uma revolução na atividade, que atingirá diretamente os empresários rurais mais atentos, que saberão tirar proveito disso, tanto para o leite, como para o corte e para a genética", salienta. Conheça a seguir como funciona cada um dos métodos de sexagem disponíveis no mercado brasileiro.

MÉTODO CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE

Cientistas da USP e da Unesp desenvolveram um novo método para sexagem de espermatozóides de bovinos. Resultado de 12 anos de estudos dos pesquisadores Vera Hossepian de Lima, Carlos Alberto Moreira-Filho e Mariney Ramalho, a principal diferença do sistema dessa tecnologia é o custo final da dose, significativamente menor do que o utilizado em outros processos, por exemplo, pela citometria de fluxo.

O equipamento usado no método desenvolvido no Brasil, uma centrífuga, custa US$ 15 mil. O valor da máquina para a citometria de fluxo, método estudado nos últimos 20 anos nos Estados Unidos e na Europa, é de US$ 280 mil. Experimentos apontaram que a técnica desenvolvida nacionalmente produz cerca de 30 vezes mais doses de sêmen sexado do que o citômetro de fluxo, em um mesmo período de tempo e com a mesma eficiência.

A Unesp-Jaboticabal iniciou as pesquisas em seleção do sexo de espermatozóides em 1993, contando com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Por essa metodologia, os espermatozóides ejaculados de touros podem ser separados em duas subpopulações, uma enriquecida com cerca de 70% a 75% de espermatozóides X (que produzirão fêmeas) e outra enriquecida com cerca de 70% a 75% de espermatozóides Y (que resultarão em machos).

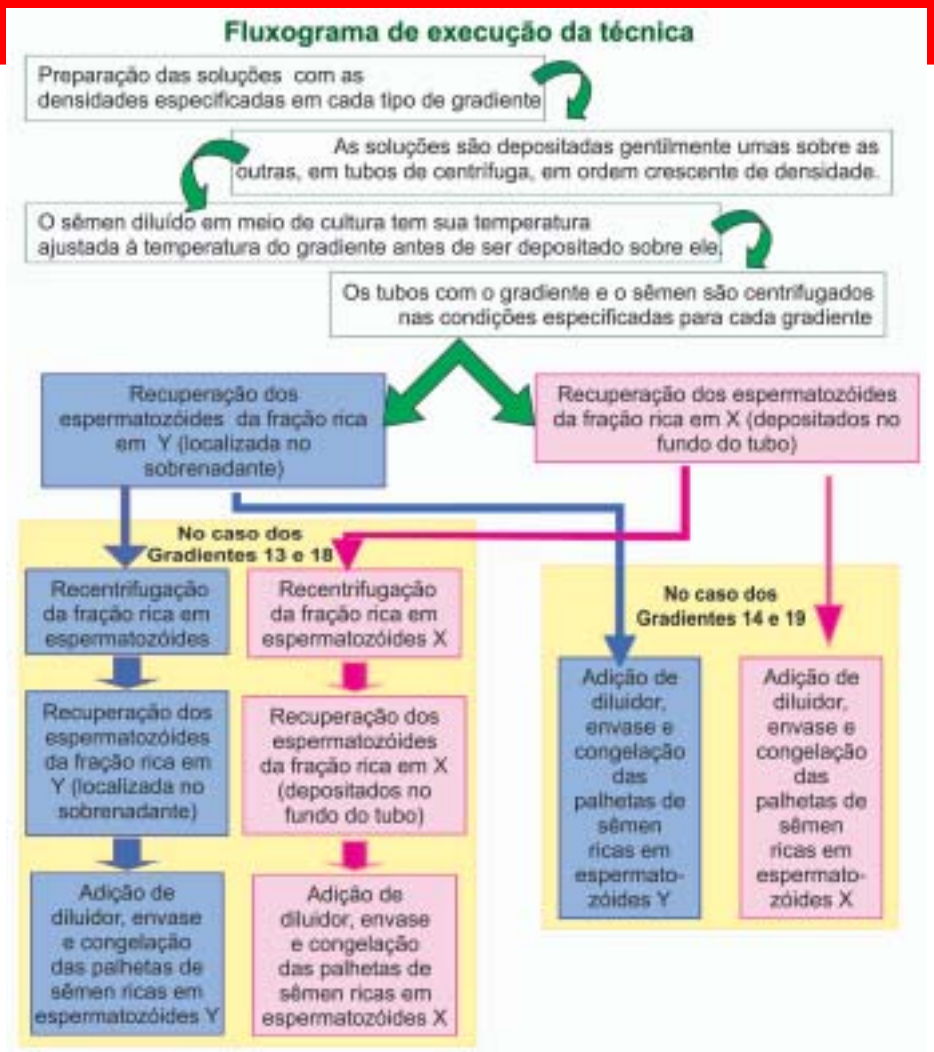
Essa separação é possível porque nos bovinos os espermatozóides X têm cerca de 4 % a mais de DNA (material genético) do que o espermatozóide Y. Essa diferença existe devido ao fato de o cromossomo X ser maior (ter maior quantidade de DNA) do que o cromossomo Y. Essa diferença pode variar entre as raças de bovinos, sendo maior em touros da raça jersey (4,24%) e menor nas raças zebuínas (3,73%). Estima-se que a diferença no conteúdo de DNA dos espermatozóides X ou Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de $7X10^{-4}$ g/cm^3 , ou 0,06% da densidade em relação a um espermatozóide X. Essa diferença faz com que a separação dos dois tipos de espermatozóide seja possível desde que se utilizem gradientes com alta resolução de densidade, ou seja, com substâncias chamadas gradientes, os espermatozóides são separados pela diferença de densidade.

Os gradientes de densidade desenvolvidos têm uma composição definida que permite manter a viabilidade desses espermatozóides de forma que eles sejam resistentes ao processo de diluição e congelamento convencionais e possam, após a descongelação, manter índices aceitáveis de viabilidade (motilidade, vigor, % de acrossoma intacto, etc.) para comercialização destinada a programas de inseminação artificial convencional (nascimentos preferencialmente do sexo feminino ou masculino) ou aqueles realizados após tratamento hormonal das fêmeas para produzir sincronização de cio e/ou múltiplas ovulações e posterior colheita dos embriões (na sua maioria do sexo feminino ou masculino) e posterior transferência para fêmeas receptoras. Além disso, a produção de sêmen poderá ser destinada à produção *in vitro* de embriões femininos ou masculinos e posterior transferência para fêmeas receptoras.

Divulgação

Rezende diz que técnica deve ser pensada como um investimento

De acordo com a pesquisadora Vera Lima, o investimento para sexagem de espermatozóides por centrifugação em gradiente de densidade é consideravelmente menor do que o método utilizado pela citometria de fluxo. "Apesar de a sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo ser o método mais estudado por vários grupos nos últimos 20 anos, devido, principalmente, à acuidade de sexagem que pode atingir até 98%, os resultados de fertilidade a campo de vários países que utilizam os espermatozóides sexados por este



método demonstram taxas desfavoráveis em algumas condições. Espermatozóides descongelados (1 a 3 milhões/dose), quando utilizados para inseminação artificial convencional, têm produzido taxa de prenhez menor que 50%, e 77% a 98% de fetos do sexo feminino", compara a especialista da Unesp.

A pesquisadora garante que o método de centrifugação em gradiente de densidade pode ser usado por empresas especializadas para produção de sêmen, enriquecidas com espermatozóides portadores de cromossomos X ou Y, sem comprometer a capacidade fecundante, e que são compatíveis com o processo de envase e congelação de sêmen existentes em tais empresas. Podem ser comercializadas para utilização em programas de IA usando a técnica tradicional (sêmen depositado logo após o cérvix), e em variadas condições de manejo reprodutivo, obtendo-se índice de prenhez e nascimentos de pelo menos 75%. Além disso, podem ser utilizadas para produção *in vitro* de embriões, obtendo-se índices de clivagem e desenvolvimento embrionário acima de 75% e 35%, respectivamente.

Segundo Vera, é difícil concluir como seriam os resultados em países como o Brasil, que possui uma pecuária caracterizada por heterogeneidade de condições de manejo. Nesse sentido, considera-se que, para o cenário brasileiro, é mais interessante optar-se por desenvolver uma metodologia de baixo custo, que atinja acuidade de sexagem em torno de 70% a 75 %, mas que permita, em condições variadas de manejo, obter-se índices de fertilidade satisfatórios. "Mesmo assim, estivemos atentos durante toda a elaboração e execução do projeto para possíveis fatores que pudessem diminuir a acuidade de separação dos espermatozóides X ou Y, durante a produção das doses de sêmen enriquecidas ou no manejo das vacas que seriam inseminadas com esse sêmen", diz Vera. Ela salienta ainda que, para a produção em escala comercial, esses cuidados deverão ser redobrados, para que não se torne inviável a produção e o emprego desse novo produto pelo mercado.

IA	Sêmen sexado	Sêmen convencional
Porcentagem de prenhez	51,26	58,46
Porcentagem de fêmeas nascidas	94,93	51,00

Números obtidos em avaliação de campo em mais de 400 novilhas nelore em condições de campo, inseminadas com uma única palheta 12 horas após a observação do cio. Trabalho publicado na IETS 2005.

MÉTODO CITOMETRIA DE FLUXO

A Goyaike Brasil Agropecuária, juntamente com a ABS Pecplan, disponibiliza a sexagem de sêmen aplicada através do processo que utiliza o citômetro de fluxo. A técnica consiste em separar os espermatozóides que contêm o cromossomo Y dos espermatozóides portadores do cromossomo X, que darão origem a bezerros machos e fêmeas respectivamente, através de uma corrente elétrica e luz ultravioleta (UV).

Nesse processo, para que o sêmen possa ser sexado, ele passa por uma preparação. Inicialmente, ele é avaliado quanto à motilidade progressiva (>60%), morfologia (>75% de espermatozóides normais) e concentração (> 1 bilhão de espermatozóides/ ml).

Posteriormente, realiza-se uma diluição por um meio e acrescenta-se um corante que se une ao DNA, que tem a particularidade de emitir fluorescência quando excitado pela luz UV. Após um tempo de incubação, a amostra é diluída com outro meio, que contém um corante específico para os espermatozóides mortos, reduzindo a fluorescência do primeiro corante mencionado, tornando o processo mais eficiente, pois permite a separação somente de células vivas. A amostra é encaminhada para o citômetro de fluxo (Moflo – Dakocytomation), equipamento onde é feita a separação dos espermatozóides.

O corante ligado ao DNA dos gametas é excitado pela luz UV proveniente da luz UV do raio laser, que gera uma fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA dos gametas. Com isso, é possível visualizar as populações dos espermatozóides portadores dos cromossomos X e Y. Um cristal envia uma descarga elétrica positiva ou negativa sobre a microgota que contém o espermatozóide selecionado e a mesma é atraída por uma placa com carga elétrica oposta. O sêmen sexado é recolhido em um tubo, refrigerado a 4ºC, envasado e posteriormente congelado.

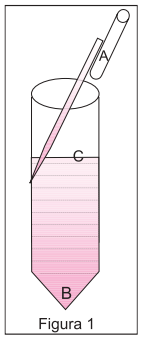


Figura 1

Esquema de demonstração da montagem de um gradiente descontínuo de densidade – as soluções de diferentes densidades são gentilmente depositadas, com o auxílio de uma pipeta, umas sobre as outras, em tubos de centrífuga, em ordem crescente de densidade. **A)** pipeta; **B)** solução com maior densidade; **C)** solução com menor densidade.

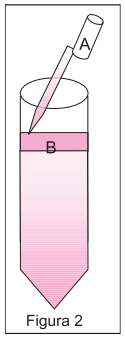


Figura 2

Esquema demonstrando a deposição do sêmen diluído sobre o gradiente. A) Pipeta; B) Sêmen diluído.

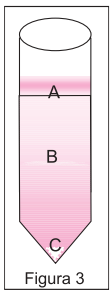


Figura 3

Esquema ilustrando um gradiente descontínuo de densidade após a centrifugação. A) Espermatozóides com baixa motilidade/vigor e debris celulares ficam retidos no topo do gradiente; B) Fração enriquecida com espermatozóides portadores do cromossomo Y; C) Fração enriquecida com espermatozóides portadores do cromossomo X.

De acordo com André Galassi, da Goyaike, a tecnologia proporciona várias vantagens para os criadores, tanto de gado de corte quanto de leite. “Para criadores de gado de corte, o uso dessa tecnologia permite escolher o sexo da cria mediante as necessidades do mercado, diminuir problemas de distocia em partos precoces, produzir tourinhos de animais com melhor mérito genético, uso em transferência de embriões e fecundação *in vitro*, programar a reposição de fêmeas e intensificar os programas de melhoramento genético. Para criadores de gado de leite, proporciona a capacidade de melhorar a genética do rebanho, programar a reposição de novilhas para cada ano e aumentar a produção de fêmeas, o que é de suma importância em rebanhos leiteiros, utilizar raças de carne em animais com menor mérito genético, e uso em transferência de embriões e fecundação *in vitro*”, explica.

Para Guilherme Marquez de Rezende, gerente de marketing da ABS Pecplan, “com a sexagem, o pecuarista pode trabalhar sua produção baseada em características genéticas que, no final, vão ser revertidas em produtos, ou seja, leite, carne, couro, subprodutos, genética, com as características procuradas pelo mercado e pelo consumidor final. Especificamente enfatizando a pecuária de elite, os ganhos imediatos para os pecuaristas são reais, uma vez que as fêmeas têm sido vendidas com valores muito acima quando comparados aos machos, principalmente nas raças zebuínas e algumas de origem européia”, comenta.

Outra importante vantagem, se não a maior, de acordo com Rezende, é a possibilidade de “programar” o nascimento do rebanho. “Na pecuária de corte, é possível produzir machos ou fêmeas segundo a necessidade do mercado, produzir touros de animais de maior mérito genético para determinadas características como: crescimento e conversão de alimento, entre outras. Em rebanhos de leite, usando o sêmen sexado, é intensificada a melhora genética sobre as fêmeas, programando a quantidade de novilhas de reposição para cada ano, produzimos ‘carne’ sobre as vacas com menor mérito genético para leite”, explica o gerente de marketing.

A ABS Pecplan oferece esse serviço desde agosto de 2004, quando tornaram a tecnologia comercial. Hoje, há sêmen sexado de várias raças já disponíveis para compra, entre elas nelore, gir, girolando, holandês, brahman e tabapuã. Os preços variam entre touros e raças, mas em média uma palheta sexada custa o dobro de outra comum. O custo desse empreendimento deve ser pensado como um investimento. “Estamos dando ao criador o que ele precisava para se programar melhor. Antes não tinha como interferir de forma eficiente na porcentagem de machos e fêmeas que nasciam no rebanho”, explica.