UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Fernanda Prado Elias

**Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro*
e de progênie a campo de touros jovens**

Ribeirão Preto – SP
2011

FERNANDA PRADO ELIAS

**Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro*
e progênie a campo de touros jovens**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética.

Ribeirão Preto-SP
2011

Ficha catalográfica

Elias, Fernanda Prado.

Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro* e progênie a campo de touros jovens / Fernanda Prado Elias;
Orientador Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo. Ribeirão Preto, 2011.
95.f.:fig.30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Genética),
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Lôbo, Raysildo B.

Folha de aprovação

Fernanda Prado Elias

Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro* e progênie a campo de touros jovens.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Genética.

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A **Deus**.

À minha **Família**.

Aos meus **Amigos**.

Agradecimentos

A Deus, que é Pai, Filho e Espírito, obrigada pelo dom da Vida e por estar em Teu abraço desde o dia em que meus olhos viram a luz deste mundo.

Aos meus amados pais, José Domingos e Sônia, os meus “melhores do mundo”, pelo amor que vivemos em família e pelo apoio incondicional para a conquista dos meus ideais, participando de todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados irmãos: Andréa, João Neto e de forma especial a Naiara, minha cunhada, que traz consigo meu primeiro sobrinho (a), nosso “embriãozinho” já muito querido e amado! A vocês, sou grata pelo carinho, amor, incentivos e momentos especiais em família!

Aos meus amados avôs: Dudu, Ocrísia (*in memorian*) e João (*in memorian*), pelos exemplos, ensinamentos, amor, e especialmente, a minha querida vovó Maria José, que mantém seu espírito repleto da fortaleza que nos une ao seu redor neste momento de recuperação de sua saúde, com todo o Amor que ela mesma sempre nos ofertou, e que neste momento tomo como minha grande inspiração!

Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo, agradeço-lhe a confiança depositada desde o dia em que entrei como estagiária de graduação no Bloco C e os aprendizados nestes nove anos de convivência harmônica e respeitosa, também lhe sou grata pelo privilégio de trabalhar com pessoas de extrema competência as quais colaboraram para o meu crescimento intelectual, técnico, moral e espiritual.

Aos membros da banca examinadora que dedicaram parte de seu tempo para a avaliação desse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 08/53804) pelo auxílio financeiro concedido a este projeto e incentivo a pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa pela bolsa de doutorado e incentivo à pesquisa.

Ao Frigorífico Barra Mansa, pelos ovários fornecidos.

Ao Técnico de Laboratório e, sobretudo, Amigo Reginaldo Aparecido Vila e toda sua família, pela amizade preciosa, conversas, aprendizado, apoio, exemplo de honestidade e caráter, sua participação foi indispensável para realização desse trabalho com competência e segurança.

À Técnica e Amiga Marli Aparecida Vanni Galerani, juntamente com sua família, pelo apoio, incentivo, ensinamentos, conversas e preciosa amizade.

Aos meus amigos queridos Pedro Alejandro Vozzi e Maria Silvina, pela valiosa contribuição na análise estatística, correções e, sobretudo, amizade, juntamente com seus filhos, meus queridos!

Ao ex-colega de pós-graduação e amigo, Fernando Henrique de Biase, pela amizade e ajuda na parte de biologia molecular.

Aos Técnicos: Sílvio Avelino dos Santos e família, Luiz Antônio Framartino Bezerra, Sebastião Paulo Framartino Bezerra e Marco Pinto Corrado, pela amizade, ajuda e agradável convivência.

As Professoras Dra. Lúcia Regina Martelli e Dra. Ester Silveira Ramos, pelos ensinamentos, amizade e incentivos.

A todos meus amigos e colegas de pós-graduação que passaram pelo Bloco C, cada um com um valor especial e com um aprendizado diferente: Ana Rosa Zambianchi, Dante Gavio e família, Maurício B. Fernandes, Cíntia R. Marcondes, Athos de A. Pastore e família, Jair Huber, José Eduardo do Val, Fábio R. P. Sousa, Daniel B. Dentilo, Juliana Meola, Ana Carolina Laus, Juliana F. Cuzzi, Flávia C. Donabela e família, Adriane Araújo e família, Álvaro F. Rios, Marcus V. Gomes, Andréa M. Silva e família, Francielle M. Araújo, Paula L. Takeuchi, Lisandra C. Caetano e família, Luciana V. Castelli e família e Karine Coelho e família.

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Micromanipulação de Embriões: Adriana Renzi, Anderson Mioranza, Rafaella C. Lemes e Vívian T. F. Cipriano, vocês deram um brilho especial na minha vida!

Aos meus atuais amigos de pós-graduação, pela amizade, conversas, incentivos e feliz convívio, especialmente: Ciro Pereira, Cristiana L. M. Furtado e família, Filipe Brum, Flávia Gaona, Karine Salomão, Héliida Magalhães, Larissa, Murilo R. Soares e Sarah Blima.

A todos (as) estagiários (as) que passaram pelo laboratório, em especial, aqueles com os quais construí laços de amizade e carinho, de modo especial a minha querida amiga Patrícia Dias da Silva Fonseca e família, Francisco L. S. Zerbini, Marcelo A. F. Rufato e aos atuais estagiários do Bloco C, Mateus e Mariana.

A minha querida amiga dona Mara pela amizade, conversas, e pelo imprescindível cafezinho de todas as horas!

Aos vigilantes do Bloco C, em especial: Cristiano, Luciano, Carlos e Milton pela atenção e segurança, principalmente nos horários noturnos.

À Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores, pela doação do sêmen usado neste trabalho, pelo fornecimento dos dados dos animais pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético Nelore Brasil e pela amizade com seus colaboradores, em especial a Rita de C. P. Lôbo e ao Danilo M. C. Oliveira.

As secretárias do Departamento de Genética da FMRP – USP, Susie, Maria e Sílvia, pela atenção e serviços prestados.

Aos meus amigos (as) externos ao laboratório, que são mais que essenciais à minha vida e que, por fazerem parte do meu todo, sabem exatamente quem são, e que me apóiam com valiosa e insubstituível amizade mesmo a mais longa distância!

A todos meus familiares que sempre me incentivaram a conquistar meus ideais...
Muito obrigada!

Por último, ao meu colega de pós-graduação Jeferson Nomelini (*in memoriam*), para sempre, na minha memória, o seu jeito peculiar de ser feliz!

“Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado. Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou. A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo. Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:
- *Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!*
Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:
- *Eu sei como ele conseguiu.*
Todos perguntaram:
- *Pode nos dizer como?*
- *É simples: - respondeu o velho.*
- *Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

ELIAS, F.P. **Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro* e progênie a campo de touros jovens.** 2011. 95f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Um dos grandes problemas que afetam a produção *in vitro* de embriões é a variação entre touros em relação à fertilidade e o maior nascimento de embriões do sexo masculino. Muitos fatores podem alterar a razão de 1:1 entre os gêneros tanto na produção *in vitro* de embriões, como no método de Inseminação Artificial. No sentido de tentar alterar esta proporção sexual *in vitro*, estudamos em um primeiro momento, a variação entre touros no desenvolvimento de embriões machos e fêmeas, distribuídos nas fases de blastocisto jovem, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, bem como, a proporção macho: fêmea em relação a fase do blastocisto. Para tanto, oócitos foram coletados de ovários oriundos de matadouro e maturados em meio de maturação em incubadora por 24h. Espermatozoides viáveis de 17 touros do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, obtidos por centrifugação em gradiente de Percoll, foram utilizados para Fecundação *in vitro*. Após 12h, os supostos zigotos foram cultivados em meio de cultivo e células do *cumulus* em incubadora. Ao sétimo dia após a fertilização *in vitro* foi feita a seleção dos blastocistos viáveis que foram sexados com a utilização de primers Y-específico bovino e autossômico bovino, com visualização dos fragmentos amplificados em gel de agarose. Posteriormente, para obtenção de maior conhecimento a respeito dos animais testados, coletamos dados de progênie a campo destes animais e verificamos a proporção sexual de seus filhos nascidos pelo método da inseminação artificial, monta natural e possíveis correlações com características quantitativas. Diferenças entre touros foram observadas em relação à proporção dos sexos para as fases de blastocisto inicial e blastocisto expandido. Não foi observado desvio da proporção sexual em relação ao touro utilizado na produção *in vitro* de embriões e progênie a campo. Nosso dados sugerem que é possível alterar a proporção macho:fêmea em sistemas de produção *in vitro* de embriões pela seleção do estágio do blastocisto para transferência, e ainda, sugerem que touros apresentam variação em relação ao desenvolvimento *in vitro* de embriões machos e fêmeas de acordo com o estágio do blastocisto.

Palavras-chave: bovino, embrião; fertilização; produção *in vitro*; proporção sexual; touro.

ABSTRACT

ELIAS, F.P. **Evaluation of the sex ratio of embryos developed in vitro and in field progeny of young sires.** 2011. 95f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Some of the main problems that affect the *in vitro* production of embryos is the variation among bulls in relation to fertility and the greater birth of male embryos. Many factors can change the ratio 1:1 between the genders, both in the *in vitro* production of embryos and in the method of artificial insemination. To try to change this sex ratio in vitro, we studied at first, the variation among bulls in the development of female and male embryos, the blastocyst-stage distributed in young blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and hatched blastocyst and the proportion male: female in relation to the blastocyst stage. For this, oocytes were collected from slaughterhouse ovaries and matured in maturation medium in an incubator for 24h. Viable sperm from 17 bulls belonging to the Breeding Program of Nellore, obtained by Percoll gradient centrifugation were used for in vitro fertilization. After 12 hours, the presumptive zygotes were cultured in culture medium and cumulus cells in an incubator. After 168 hours of *in vitro* fertilization the viable embryos in the blastocyst stage were classified. The determination of the sex of the blastocysts was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using a Y-specific sequence and bovine autosomal sequence visualized in agarose gel. Data analysis was conducted using the Statistical Analysis System software. Later, to obtain more knowledge about the animals tested, data was collected from the field progeny of these animals and established the sex ratio of the offspring produced by the method of artificial insemination, natural mating and possible correlations with quantitative traits. Differences between bulls were observed relating to the proportion of genders at the initial stages of blastocyst and expanded blastocyst. No deviation was observed in the sex ratio in relation to the bull used for in vitro production of embryos and offspring in the field. Our data suggest that it is possible to change the male to female proportion in production systems of *in vitro* embryos through the selection of the blastocyst stage for transfer, and also suggest that bulls show variation in relation to the *in vitro* development of male and female embryos, depending on the blastocyst stage.

Keywords: bovine; embryo; fertilization; in vitro production; sex ratio; sire.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexo <i>cumulus</i> oócito aspirados de folículos ovarianos.....	40
Figura 2: Complexo <i>cumulus</i> oócito após maturação <i>in vitro</i>	41
Figura 3. Blastocistos viáveis ao sétimo dia de desenvolvimento após a fertilização <i>in vitro</i>	43
Figura 4. Visualização dos fragmentos amplificados pela reação em cadeia de polimerase ..	44
Figura 5: Comparação entre a porcentagem de embriões desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo (número de embriões divididos pelo número de oócitos) por meio de fertilização <i>in vitro</i> entre 17 touros avaliados	48
Figura 6: Comparação entre o número de blastocisto inicial desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	52
Figura 7: Comparação entre o número de blastocisto inicial desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	53
Figura 8: Comparação entre o número de blastocisto machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	54
Figura 9: Comparação entre o número de blastocisto total machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	54
Figura 10: Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	55
Figura 11: Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	56
Figura 12: Comparação entre o número de blastocisto ecodido machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	57
Figura 13: Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização <i>in vitro</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers usados na PCR para transcritos de embriões bovinos.....	44
Tabela 2: Proporção sexual de embriões totais bovinos ao sétimo dia após a fertilização <i>in vitro</i> de 17 touros por meio de fertilização <i>in vitro</i>	51
Tabela 3: Proporção sexual de filhos nascidos a campo por meio de Inseminação Artificial	60
Tabela 4: Proporção sexual de filhos nascidos a campo por meio de monta natural	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Be –	Blastocisto eclodido
Bi –	Blastocisto jovem
Bl –	Blastocisto
Bx –	Blastocisto expandido
CIV –	Cultivo <i>in vitro</i>
COC –	Complexo <i>cumulus</i> oócito
DEP –	Diferença Esperada na Progenie
DPI –	Desenvolvimento pré-implantacional
FIV –	Fecundação <i>in vitro</i>
FMRP –	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IA –	Inseminação Artificial
LMEM –	Laboratório de Micromanipulação de Embriões e Molecular
MGT –	Mérito Genético Total
MIV –	Maturação <i>in vitro</i>
OPU –	do inglês <i>Ovum Pick Up</i> (Punção Folicular)
PF –	Punção Folicular
PCR –	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PIV –	Produção <i>in vitro</i>
PMGRN –	Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore.
QTL –	do inglês <i>Quantitative Trait Locus</i> (<i>Locus</i> de característica quantitativa)
SAS –	do inglês <i>Statistics Analysis System</i> (Sistema de Análise Estatística)
TE –	Transferência de embriões
USP –	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
μl	microlitros
μg	microgramas
μM	micromolar
ml	mililitros
mM	milimolar
UI	unidade internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. Desenvolvimento pré-implantacional	24
3.1.1. Fertilização	24
3.1.2. Ativação do genoma embrionário	27
3.1.3. Compactação	27
3.1.4. Formação do blastocisto	28
3.2. A proporção sexual e o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões bovinos.	29
3.2.1. Fatores alteradores da proporção sexual	29
3.2.2. Métodos tradicionais de determinação sexual em laboratório	33
3.3. Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore.....	35
3.3.1. Avaliação das características reprodutivas.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Colheita de oócitos e Maturação <i>in vitro</i>	40
4.2. Seleção de espermatozóides e ajuste da concentração espermática.....	41
4.3. Capacitação espermática e fecundação <i>in vitro</i>	42
4.4. Cultivo <i>in vitro</i>	42
4.5. Classificação dos embriões viáveis.....	43
4.6. Sexagem dos embriões.....	43
4.7. Análise estatística	45

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Influência do touro no desenvolvimento e no sexo do embrião.	47
5.2. Influência do touro e do estágio do blastocisto na proporção sexual	52
5.3. A proporção sexual na progênie a campo	60
5.4. Proporção sexual e características quantitativas do melhoramento genético.	62
 6. CONCLUSÕES.....	 65
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 67
 ANEXO.....	 76

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as biotecnologias reprodutivas têm despontado no cenário mundial como ferramentas importantes para o desenvolvimento da pecuária, pois auxiliam na identificação, seleção e multiplicação mais rápida de animais geneticamente superiores (BADR *et al.*, 2007).

Uma das grandes vantagens do uso das biotecnologias reprodutivas é que elas permitem diminuir o intervalo de gerações, além de aumentarem a eficiência reprodutiva da fêmea, causando aceleração do processo de melhoramento genético dos rebanhos. Dentre as várias técnicas existentes, destacam-se, no Brasil, a transferência de embriões (TE) e a fecundação *in vitro* (FIV); sendo que no ano de 2002, o país foi responsável por 50% dos embriões produzidos no mundo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [EMBRAPA], 2005).

Os protocolos de fecundação *in vitro* são usados com sucesso em muitas áreas das ciências aplicadas como: pesquisas, tratamentos de infertilidade, conservação de espécies ameaçadas e também para aumento de produtividade dos alimentos de origem animal (BAVISTER, 2002). Isso se deve à possibilidade de gerar um grande número de embriões viáveis, os quais, após transferência em fêmeas receptoras, estão aptos para progredirem numa geração saudável.

A produção de embriões de mamíferos domésticos de interesse econômico, por meio das técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) é uma importante biotecnologia da reprodução para o melhoramento genético animal, podendo gerar um grande número de embriões que serão utilizados em outras técnicas como a clonagem e a manipulação de genes. Em bovinos, a técnica de FIV associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular (PF) *in vivo*, pode servir como instrumento importante para o melhor aproveitamento do potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (PEGORARO *et al.*, 1998).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) apresenta inúmeras vantagens e aplicações, além das já citadas como (1) determinação e controle do sexo dos produtos; (2) aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; (3) rápidas e melhores possibilidades para executar programas de acasalamento; (4) aumento da acurácia do efeito materno e de seu

valor genético sobre a descendência; (5) rápida multiplicação de raças; (6) facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; (7) formação de bancos de gametas congelados; (8) aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e (9) estudo e desenvolvimento de outras biotecnologias reprodutivas, a partir da micromanipulação de embriões (PALMA *et al.*, 1998). No entanto, para que essa tecnologia de fecundação *in vitro* seja aplicada de maneira intensiva e comercial, particularmente para as espécies bovinas, vários problemas têm sido investigados a fim de se alcançar um nível totalmente viável de aplicabilidade.

Com o suporte técnico do Laboratório de Micromanipulações de Embriões e Molecular (LMEM) do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), anualmente, touros jovens que são selecionados por apresentarem alta precocidade sexual, têm suas fertilidades avaliadas por meio da técnica de Fertilização *in vitro* obtendo, dessa forma, informações que visam incrementar a avaliação genética desses animais. Com isso, a disponibilidade de sêmen de diversos touros favorece o direcionamento de pesquisas ligadas ao efeito do macho em sistemas de produção *in vitro* de embriões.

O desvio da proporção sexual das progênies oriundas de embriões *in vitro* tem sido uma das maiores preocupações por parte de selecionadores e pesquisadores. Esta variável quando expressa em grandes volumes afeta a estratégia de seleção principalmente para selecionadores que buscam melhoramento genético por seleção de fêmeas de reposição. As diferenças na proporção macho-fêmea, alterada em 1:1 estão relacionadas sobre tudo às condições de cultivo impostas ao desenvolvimento de embriões (GUTIERREZ *et al.*, 2001). Os exemplos mais frequentes estão bem evidenciados nas taxas e velocidade de clivagem nos primeiros dias de cultivo que favorecem os embriões do sexo masculino. Esta característica é amplificada quando da seleção de blastocistos para transferência ao sétimo dia de cultivo (BREDBACKA *et al.*, 1996; AVERY *et al.*, 1989). Os sistemas e meios de cultivo favorecem o crescimento de embriões masculinos em detrimento de embriões femininos.

Embriões produzidos *in vitro*, na maioria das espécies, dividem-se já nos primeiros dias de desenvolvimento em dois grupos definidos: clivagem rápida e clivagem lenta, dos quais há predominância de machos e fêmeas, respectivamente (KOCHHAR *et al.*, 2003). Este achado induz à associação de que o desvio sexual é um fator de estreita ligação com a cinética de desenvolvimento. Baseado nesta afirmação, uma vez já comprovado o

efeito do touro na cinética e taxa de desenvolvimento de blastocistos (EID *et al.*, 1994; WARD *et al.*, 2001), permite-se supor que o sêmen de diferentes touros pode interferir no desvio da proporção sexual dos embriões *in vitro*, e que estes touros apresentarão diferentes proporções de desvio sexual em seus embriões desde que o efeito materno esteja minimizado e as condições de cultivo uniformizadas

Este trabalho desenvolveu, em sua primeira etapa, o conhecimento de desvios da proporção sexual de embriões *in vitro* de acordo com touros de alta precocidade sexual utilizados na FIV. Em seguida, uma vez identificados touros com altos desvios na proporção sexual de seus embriões, estudou-se o comportamento entre cinética de desenvolvimento e o sexo dos embriões nos períodos iniciais de desenvolvimento a fim de minimizar o desvio sexual pela seleção do blastocisto para transferência. Verificou-se também, para os mesmo touros utilizados na FIV, a proporção macho: fêmea em sua progênie a campo obtida pelo método de inseminação artificial e monta natural, além de possíveis associações com características quantitativas utilizadas na avaliação genética do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore - Nelore Brasil.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Supondo que o sêmen de diferentes touros poderia interferir no desvio da proporção sexual dos embriões *in vitro*, e que estes touros apresentariam diferentes proporções macho:fêmea de seus embriões nas diferentes fases do blastocisto, este trabalho teve por objetivos:

- Avaliar desvios de proporção sexual de embriões desenvolvidos *in vitro* de acordo com o touro utilizado na fertilização *in vitro*;
- Avaliar a influência da cinética do desenvolvimento *in vitro* dos embriões na proporção sexual nas seguintes fases do estágio de blastocisto: blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido.
- Verificar o desvio de proporção sexual dos filhos nascidos a campo dos touros avaliados por meio de inseminação artificial e monta natural.
- Verificar a correlação entre características reprodutivas quantitativas dos touros avaliados com o desvio de proporção sexual de seus embriões.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Desenvolvimento pré-implantacional

O desenvolvimento pré-implantacional é um dos responsáveis pelo direcionamento da formação de um embrião competente para a implantação, de modo que, interações metabólicas com o útero possam ocorrer, a prenhez possa ser iniciada e o desenvolvimento fetal possa ser sustentado (WATSON, 1992).

O principal objetivo do desenvolvimento de pré-implantação é a formação de uma estrutura esférica preenchida por fluido chamada blastocisto o qual é composto por uma camada de células externas chamada de trofoectoderma epitelial (TE) que circunda um pequeno grupo de células chamado de massa celular interna (MCI) e uma grande cavidade preenchida por fluido (GOOSSENS *et al*, 2007).

Um desenvolvimento normal de pré-implantação pode ser caracterizado pelas sucessivas clivagens a partir do oócito fertilizado, pela ativação da transcrição do zigoto, compactação e cavitação, conduzindo a formação do blastocisto. A expressão gênica espacial e temporalmente adequada durante o desenvolvimento de pré-implantação do embrião é pré-requisito para um crescimento normal que gere um indivíduo saudável (PONSUKISILI *et al.*, 2002).

3.1.1. Fertilização

Mais do que simplesmente o encontro e a fusão entre o gameta feminino e o masculino, a fertilização é a etapa inicial do desenvolvimento que permite a formação de um zigoto, com um novo potencial genético e com uma nova disposição do citoplasma, capaz, agora, de se desenvolver em um novo organismo multicelular. (GILBERT *et al*, 2003).

Durante a evolução dos mamíferos, modificações tem ocorrido conduzindo à fertilização interna entre os gametas, de maneira que estas modificações se tornaram mecanismos de adaptação à evolução juntamente com vários parâmetros evitando, desta maneira, o acúmulo irreversível de mutações prejudiciais diante de um ambiente competitivo e passivo de mudanças (HAFEZ & HAFEZ; 2004).

A fertilização nos mamíferos requer três eventos críticos: (a) migração espermática entre as células do cumulus (caso estejam presentes); (b) fixação espermática através da zona pelúcida e (c) fusão do espermatozóide e da membrana plasmática do oócito. Imediatamente após a fertilização, a superfície do ovo sofre modificações para impedir a penetração de espermatozóides adicionais. Quando este mecanismo falha pode ocorrer uma fertilização polispérmica com formação de embriões poliplóides, que podem ter morte embrionária ou desenvolvimento anormal (HAFEZ & HAFEZ; 2004).

Esta etapa traz consigo o encontro de genomas haplóides de duas células altamente diferenciadas, os gametas, dentro do citoplasma do oócito. Uma das primeiras atividades do embrião fertilizado é reprogramar o genoma embrionário recém formado para um estado totipotente. Tal reprogramação baseia-se em extensas modificações epigenéticas do genoma que coordenam as interações entre o núcleo e o citoplasma. (DURANTHON, WATSON & LONERGAN, 2008). No desenvolvimento normal de mamíferos, logo após a fertilização, o genoma masculino é rapidamente desmetilado por um mecanismo ativo, que depende de expressão gênica e de síntese protéica, enquanto o feminino sofre demetilação passiva nas divisões celulares subsequentes (LIU *et al.*, 2004; DING *et al.*, 2008).

Assim, durante a fertilização, os genomas dos gametas estão, inicialmente, com a atividade de transcrição silenciada, então, a reprogramação é concomitante com a ativação do genoma embrionário (DURANTHON, WATSON & LONERGAN, 2008).

Utilizando-se a fertilização *in vitro*, aqueles embriões produzidos a partir do sêmen de touros com diferentes fertilidades *in vivo* diferem na habilidade para desenvolver. Touros de alta fertilidade entram na fase S do ciclo celular mais cedo, clivam mais rápido para estágio de duas células e desenvolvem melhor para estágio de blastocisto (EID; PARRISH, 1995; COMIZZOLI *et al.*, 2000). A taxa de clivagem pode ser similar entre touros, porém a produção de embriões difere, sugerindo que espermatozóides mostram diferenças qualitativas que são reveladas somente quando o embrião avança até o estágio de blastocisto (LONERGAN, 1994; ACCORSI, 2001).

Segundo Holm *et al.* (1998), a duração do ciclo celular das clivagens iniciais varia entre embriões viáveis e embriões não viáveis 174h após a inseminação. Embriões viáveis tendem a avançar os ciclos celulares mais rapidamente que embriões não viáveis, apresentando, portanto, melhor cinética de desenvolvimento.

Tanto a viabilidade dos embriões, como o início do seu desenvolvimento dependem fortemente dos estoques de macromoléculas informacionais de herança materna. Porém, o componente paterno não pode ser subestimado. O espermatozóide que fertilizou o oócito traz consigo proteínas e componentes celulares que interferem no início dos ciclos celulares de embriões.

Recentemente, tem sido reportada a presença de RNA no espermatozóide maduro e que é liberado no oócito durante a fertilização e permanece até o início da expressão gênica embrionária (OSTEMEIER *et al*, 2004; BOERKE, DIELEMAN & GADELLA, 2007). Em 1994, Eid *et al.* verificou que o tamanho da fase S no primeiro ciclo celular estava relacionado com a fertilidade do touro.

Comizzoli *et al.* (2000) mostrou que o início dessa fase é determinado pelo touro durante a fase G1 do zigoto, usando sêmen com potencial de desenvolvimento distinto, ele verificou que quanto mais cedo o zigoto iniciava a fase S do ciclo celular, mais blastocisto ele produzia, porém esse efeito paterno acontecia apenas durante o período da fase G1 anterior a fase S. Quais fatores contêm os elementos que tornam possíveis o início da fase S (compreendido como a duplicação do DNA até o início da primeira clivagem) ainda precisam ser compreendidos. Em síntese, o espermatozóide bovino tem um papel fundamental no citoplasma do oócito para o início do primeiro ciclo celular, o que causará impacto no subsequente desenvolvimento embrionário.

Navara; First; Schatten (1996) demonstraram que há uma variação dependente do touro em relação ao tamanho e a organização do áster espermático sugerindo que isso pode trazer conseqüências para o desenvolvimento do embrião. Os touros com maior fertilidade possuíam os maiores e mais bem organizados centrômeros aproximando de forma mais rápida os pró-núcleos feminino e masculino acelerando o início da primeira fase S da primeira divisão de clivagem. Em contraste, os touros com menores fertilidades *in vitro* tinham os centrômeros menores e não bem organizados, e isso demonstra que o espermatozóide contribui com alguns componentes cujos efeitos somente podem ser observados após a penetração do espermatozóide no oócito, ou seja, alguns fatores não dependem da taxa de penetração.

3.1.2. Ativação do genoma embrionário

Os primeiros dias do desenvolvimento de mamíferos são sustentados pela transcrição de genes e polipeptídios produzidos e estocados no oócito durante a oogênese que são gradativamente degradados enquanto a atividade transcricional do genoma embrionário aumenta de forma progressiva (WATSON & BRACOLT, 2001).

Após as três primeiras clivagens, o controle genético do desenvolvimento torna-se assegurado pelo embrião com o declínio dos produtos gênicos do oócito e então, a transcrição embrionária se inicia (DE SOUSA *et al.*, 1998). Este momento é um evento crítico, pois a morfogênese resultante do embrião após a formação do blastocisto é dependente da expressão dos genes do embrião (WATSON, 1992).

Esta mudança de controle gênico materno para embrionário inclui a perda de moléculas de mRNA de origem materna, ativação da transcrição do genoma embrionário, detenção do desenvolvimento na presença de inibidores transcritos e uma mudança significativa no padrão da síntese de proteínas (TELFORDE *et al.*, 1990). Esta transição é fundamental para a ativação de um grande número de genes e para o padrão seguinte de expressão de genes que é responsável pela diferenciação embrionária e desenvolvimento bem sucedido (LONERGAN *et al.*, 2003).

Em bovinos, a grande ativação do genoma embrionário ocorre na fase de 8 a 16 células e inclui um aumento de mRNA transcritos do genoma embrionário, juntamente com a mudança significativa do padrão de síntese protéica (BADR *et al.*, 2007).

3.1.3. Compactação

O fenômeno da compactação é talvez a principal diferença entre a clivagem de mamífero e todos os outros tipos de animais. Essa etapa permite o posicionamento de células externas e internas já no estágio de mórula; a maioria das células externas será precursora do trofoblasto enquanto que a maioria das células internas precursora da massa celular interna (GILBERT, 2003).

O primeiro passo de diferenciação da compactação é estabelecer a comunicação intercelular. A compactação é sinalizada por um aumento no contato entre as células

embrionárias entre blastômeros, impulsionada pela criação de junções aderentes consistidas de complexos de caderina e catenina (BADR *et al*, 2007).

Durante o estágio de 64 células, a massa celular interna e as células do trofoblasto se tornam camadas de células separadas, nenhuma delas contribuindo para células do outro grupo. Essa separação dá-se graças ao processo chamado de cavitação, quando as células do trofoblasto passam a secretar fluido para dentro da mórula, este fluido acaba por posicionar o grupo de células da massa celular interna para um lado do anel de células do trofoblasto culminando na formação do blastocisto. (GILBERT, 2003).

3.1.4. Formação do blastocisto

Após o desenvolvimento de junções intercelulares compactas da mórula durante a fase de compactação, ocorre o acúmulo de fluido dentro da cavidade central, formando a blastocele. Posteriormente, há então a diferenciação de duas camadas distintas de células: a maioria das células forma a camada externa periférica cuboidal, o trofoblasto; enquanto um segundo grupo de células localizado em um pólo abaixo do trofoblasto forma o embrioblasto, a massa celular interna, que se desenvolve nas três camadas germinativas primárias do embrião (ectoderma, mesoderma e endoderma) durante o processo de gastrulação (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

A formação do blastocisto, ou cavitação, é dependente da diferenciação do trofoblasto, pois é a função de transporte de íons e água do TE que medeiam a dinâmica dos fluidos. Assim, ATPase de Na/K, aquaporinas (AQP, canais de água), e junções tipo *tight* atuam coordenando a formação de blastocisto (WATSON, 1992).

Enquanto poucos estudos tem se direcionado a examinar o padrão temporal de abundância de transcritos do zigoto até o blastocisto, a grande maioria se concentra em descrever a abundância de transcritos somente na fase de blastocisto. Ainda que o blastocisto seja indubitavelmente a grande realização do desenvolvimento pré-implantacional, é importante recordar que o blastocisto é produto de uma sequência de eventos orquestrados que o precedem (DURANTHON, WATSON & LONERGAN, 2008).

3.2. A proporção sexual e o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

3.2.1. Fatores alteradores da proporção sexual

Os estoques de transcritos e proteínas acumulados pelo oócito primário são responsáveis pelo direcionamento dos eventos durante a maturação do oócito, fertilização, e início do desenvolvimento embrionário. Desta forma, a escolha de folículos de tamanhos com alta probabilidade de conter oócitos competentes ou de diâmetros de oócitos nos quais esse programa biológico está correto reduziria qualquer variação relacionada ao oócito no desenvolvimento *in vitro* de blastocistos (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999).

Além disso, fatores genéticos como o sexo embrionário influencia o desenvolvimento *in vitro*. Tem sido sugerido que a seleção de embriões em estágios mais avançados para transferência em receptora conduz a uma proporção sexual alterada na progênie (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001), pois se sabe que embriões machos bovinos desenvolvem-se ao estágio de blastocisto mais rápido que os embriões fêmeas (AVERY *et al.*, 1992), um fenômeno que aparentemente pode ser alterado pelas condições de cultivo (BRADBACKA; BREDBACKA, 1996). Desse modo, as condições do meio de cultivo dos embriões podem interferir na cinética do desenvolvimento alterando a duração dos ciclos celulares (HOLM *et al.*, 1998).

A proporção sexual de bezerros nascidos e embriões produzidos *in vivo* é de aproximadamente 1:1. Pode ser o processamento diferencial e preferencial do espermatozóide portador de X ou Y no trato reprodutivo da fêmea ou *in vitro* que faz machos iniciarem o desenvolvimento mais cedo que as fêmeas. Assim, o tempo de inseminação ou acasalamento no ciclo de cada animal ou a interação gamética *in vitro* pode afetar o processo de fertilização dando a um sexo a vantagem de desenvolvimento em relação a outro. A proporção sexual dependeria, então, do estado de maturação do oócito e da cinética de interação entre o espermatozóide e o oócito (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

In vivo, o espermatozóide ejaculado deve percorrer uma longa distância ao longo do trato reprodutivo da fêmea e somente uma pequena parte deste espermatozóide, de fato, atinge o oócito. Além disso, acontecem muitas interações complexas entre o espermatozóide e os fluidos do útero, das células epiteliais do oviduto e das células da granulosa antes do espermatozóide ligar-se a zona pelúcida dos oócitos. Ao contrário, nas condições *in vitro*, o espermatozóide pode atingir

imediatamente as células do cumulus ou a própria zona pelúcida dos oócitos. Neste caso, a presença destas células do cumulus, o tempo de co-incubação do espermatozóide e do oócito e a concentração dos espermatozoides são os maiores fatores para o sucesso da fertilização *in vitro* (IWATA *et al.*, 2008). Além disso, a exposição prolongada entre oócitos e espermatozoides tem efeito ruim na fertilização e no desenvolvimento embrionário, pois gera uma quantidade excessiva de espécies reativas ao oxigênio na cultura que envolve a peroxidação de ácidos poliinsaturados nas membranas celulares reduzindo sua fluidez e flexibilidade necessária para a fusão oócito – espermatozóide e subsequente qualidade de desenvolvimento do embrião (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

O desenvolvimento de procedimentos confiáveis para o cultivo e produção *in vitro* de embriões criou a oportunidade de se ganhar conhecimento sobre estágios iniciais de desenvolvimento embrionário de diversas espécies (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

Os embriões estão sujeitos a uma vasta quantidade de fatores de estresse que levam a mecanismos de respostas para tentar preservar o balanço homeostático no embrião. Estes mecanismos de respostas podem ser de curto prazo (mudanças na morfologia, proliferação celular e apoptose, metabolismo, transcriptoma e proteoma) ou médio e longo prazo: diminuição na taxa de prenhez, aumento do risco de aborto, anormalidade congênita, morte pós-natal ou doenças na fase adulta (FEUGAN *et al.*, 2009).

Embriões machos e fêmeas desenvolvem-se em taxas diferentes *in vitro*, mas não *in vivo* e isto faz deduzir que o desenvolvimento influenciado pelo sexo pode ser alterado pelo sistema de cultivo. Nas espécies bovinas, o início e a duração da replicação do DNA são afetados por diversos fatores regulados paternalmente, e a duração desta fase S é correlacionada ao subsequente potencial de desenvolvimento embrionário (EID *et al.*, 1994; COMIZZOLI *et al.*, 2000). Há também variações em relação à fertilidade entre touros, ou ainda, entre ejaculados distintos de um mesmo reprodutor, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, existem ainda muitas lacunas na nossa compreensão do efeito paterno no desenvolvimento embrionário (ALOMAR *et al.*, 2006).

O tipo de substrato energético também pode influenciar no sexo. Por exemplo, a glicose em alta concentração num sistema de cultivo livre de células promove um desenvolvimento mais rápido de embriões machos (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

Devido a seu complemento cromossômico sexual os embriões machos e fêmeas diferem quanto aos genes e seus números de cópias codificantes nestes cromossomos (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

Taxas mitóticas maiores em embriões machos com um único cromossomo X e Y foram inicialmente atribuídas à expressão inicial de genes do cromossomo Y, tais como a proteína *zincfinger* Y (ZFY) e gene Y relacionado ao sexo (SRY) que é conhecido por ter propriedades mitogênicas. Ambos estes genes são expressos tão logo se iniciam os estágios de 2-8 células em machos (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

A compensação de dose para os genes ligados ao X implica na inativação de um cromossomo X de modo que seus genes não sejam transcritos, estabelecendo equivalência funcional com os machos. Trata-se de um processo gradual que começa com a expressão do transcrito específico do X a ser inativado (XIST) após a fertilização e é detectado em bovinos a partir do estágio de 8 células. Outras características da inativação do X como a heterocromatização do cromossomo X inativo não aparece até o estágio de blastocisto (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

Pode-se especular que a maior expressão de genes vitais no cromossomo X antes da inativação e compensação de dose que ocorrem nas fêmeas contribui para as taxas diferenciais de desenvolvimento notadas entre machos e fêmeas. Genes candidatos incluem a glicose – 6 – fosfato desidrogenase (G6PD) e hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) pois ambos controlam funções metabólicas chaves e estão localizados no cromossomo X e estão sujeitos à inativação do cromossomo X (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

A G6PD é uma enzima da via pentose fosfato (PPP) que produz equivalentes redutores (NADPH) e ribose – 5 – fosfato, o precursor de todos os nucleotídeos. O NADPH é fundamental para a manutenção da glutadiona na sua forma reduzida a qual é crítica para a desintoxicação de radicais livres reativos e hidroperóxidos lipídicos. HPRT é uma enzima “salva-vidas” convertendo bases purina em seu nucleotídeo correspondente (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

Existem vários trabalhos que mostram que o desenvolvimento influenciado pelo sexo pode ser reduzido pelas condições do cultivo *in vitro*. Os relatos em que os embriões machos desenvolveram-se de forma mais rápida têm usado meios Menezo’s e B2, enquanto

que aqueles que não relatam diferença têm usado TCM 199. O tipo de substrato energético no meio é suspeito de influenciar no desenvolvimento (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

O uso de soro fetal bovino tem sido relacionado com susceptibilidade à criopreservação do embrião, aberrações cromossômicas, alta taxa de perda fetal, complicações na gestação e alta taxa de perda neonatal associada à Síndrome do Bezerro Grande (*Large Offspring Syndrome*). Por outro lado, o SFB aumenta a cinética do desenvolvimento, o número de células e o número de blastocistos que crescem a este estágio. Um sistema baseado em componentes definidos, livres de constituintes celulares ou componentes do sangue, seria ideal do ponto de vista sanitário e controle de qualidade (FEUGAN *et al*, 2009).

Estudos sobre a proporção macho:fêmea de embriões cultivados na presença de SFB tem sido apresentados com uma certa controvérsia, enquanto Gutiérrez-Adan *et al.* (2001) encontrou maior número de embriões machos em relação as fêmeas com uso do SFB, outros autores como Gilard *et al.* (2004) constataram que os uso de SFB e Albumina Sérica Bovina (BSA) não interferia nesta proporção.

Condições sub-ótimas do meio de cultivo durante o terceiro e quarto ciclo celular podem conduzir a um bloqueio completo do desenvolvimento no estágio de 8-16 células (EDWARDS *et al.*, 1997; POLLARD, 1991) sugerindo que a taxa de clivagem tende a diminuir nessas condições (HOLM *et al.*, 1998).

O método de seleção dos espermatozóides para sua utilização em protocolos de fertilização *in vitro* também tem sido investigado como fator capaz de alterar a proporção macho:fêmea de embriões desenvolvidos *in vitro*. O gradiente de Percoll tem sido amplamente utilizado na seleção de espermatozóides para fertilização *in vitro* de bovinos (PARRISH *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 2003). Outro método utilizado técnica de *Swim-up* que seleciona por via ascendente os espermatozóides que atingem a superfície do meio após o período de incubação (RHEINGANTZ *et al.*, 2002).

Wolf e colaboradores (2008) verificaram que o sêmen selecionado pelo método de *Swim-up* resultava numa quantidade maior de embriões machos, enquanto que o gradiente descontínuo de Percoll 45-90% não apresentava variação nas porcentagens de embriões machos e fêmeas. Por outro lado, um gradiente contínuo de Percoll 67,5% apresentava maior produção de embriões fêmeas.

Outro fator relacionado à distribuição assimétrica entre os sexos tem sido a posição direita ou esquerda do corno uterino em que é gerado o bezerro. Hylan *et al* (2009) conduziram uma série de experimentos para avaliar proporção macho:fêmea de bezerros gerados nos cornos uterinos direito e esquerdo, e verificaram que a quantidade de machos foi maior em animais gestados no corno uterino direito de vacas acasaladas naturalmente quando comparadas com aqueles gerados no corno uterino esquerdo.

Muitas outras características tem sido relatadas como fatores capazes de alterar a razão sexual em bovinos, tais como, o nível de testosterona no líquido folicular bovino (GRANT & IRWIN, 2005; GRANT *et al*, 2009), a época de inseminação (MARTINEZ *et al*, 2004) e o estado de maturação do oócito no momento da inseminação artificial (GUTIERREZ-ADAN *et al*, 1999). Outras hipóteses também tem sido feitas sugerindo que o oócito após a ovulação já estaria adaptado para receber um espermatozóide X ou Y (GRANT & CHAMLEY, 2007).

3.2.2. Métodos tradicionais de determinação sexual em laboratório

Tradicionalmente, para a produção de embriões sexados era necessário a biópsia do embrião o que comprometia a sua viabilidade *in vitro* e era economicamente viável apenas quando estes embriões podiam ser transferidos a fresco (Hasler *et al*, 2002). Além disso, alguns protocolos de produção *in vitro* parecem favorecer o desenvolvimento de embriões machos sendo o número de embriões fêmeas - de boa qualidade e viável para diagnóstico de sexo - muito pequeno (Peippo *et al*, 2010).

Atualmente, os métodos tradicionais de seleção do sexo de embriões em laboratório são, principalmente, o uso das biotecnologias do sêmen sexado e da biópsia embrionária. Os dois métodos representam um custo significativo para o laboratório (ALLAM & ZOHEIR, 2010).

O Brasil tem se destacado como um dos países que mais aplica comercialmente e em larga escala as diversas biotecnologias utilizadas na reprodução animal. 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. Por meio dessas tecnologias, o criador pode escolher o sexo desejado ainda

na fase embrionária, reduzindo custos com receptoras, tratamentos hormonais para sincronização, manejo e locação de espaço na propriedade (ALONSO *et al.*, 2006).

Na última década, pesquisas relacionadas à sexagem do sêmen vêm sendo desenvolvidas como alternativa para o diagnóstico pré-implantacional. Pela sua simplicidade, a inseminação artificial com sêmen sexado seria o método ideal para escolher o sexo dos bovinos. Infelizmente, as técnicas de separação dos espermatozóides X e Y ainda não oferecem as condições básicas (de inocuidade, eficiência, reprodutibilidade, simplicidade, rapidez e economia) para que o método tenha uma aplicação comercial em larga escala (ALMEIDA; ALVAREZ, 2003).

As diferenças nas taxas de desenvolvimento entre embriões fêmeas e machos produzidos por sêmen sexado tem sido relatados. No entanto, em outros estudos, a cinética de desenvolvimento do embrião feminino e masculino foram semelhantes. A expressão diferencial de genes do desenvolvimento importantes entre os embriões produzidos por sêmen sexado e sêmen convencional também foi observada. Até o presente momento, apenas um estudo relatou dados de qualidade do embrião e a da razão de sexo real de embriões produzidos por sêmen sexado (PEIPPO *et al.*, 2009).

Apesar disso tudo, em 2004, o Brasil entrou no rol dos países que contam com a produção e comercialização de espermatozóides sexados. As empresas que operam no mercado têm seu foco na produção *in vitro* de embriões já que o Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo e são feitas mais de 100 mil transferências de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, que representam 62.5% do total de 160.000 embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, mundialmente (HOSSIPIAN de LIMA, 2006).

De acordo com os resultados encontrados por Peippo *et al.* (2010) o uso de sêmen sexado não afetou a qualidade e as taxas de produção de embriões, no entanto, verificou-se diferenças entre os grupos de sêmen X e Y, sendo que os oócitos fertilizados com espermatozóide Y apresentaram maior taxa de fecundação, clivagem e produziram mais embriões aptos a transferência e com melhor qualidade do que aqueles oócitos fertilizados com espermatozóide X. Em relação à cinética do desenvolvimento, ao sétimo dia de cultivo, nenhuma diferença foi encontrada na produção de embriões entre os grupos de sêmen sexado X e Y, entretanto, ao oitavo dia de cultura, os oócitos fertilizados com o sêmen Y produziram mais embriões transferíveis do que aqueles fertilizados com espermatozóide X, refletindo um desenvolvimento mais lento dos zigotos produzidos com espermatozóide X.

Tendo em vista necessidade de métodos práticos para utilização em laboratórios de fertilização *in vitro* visando à seleção de embriões machos e fêmeas, este trabalho, pretende verificar a influência da morfologia do embrião no estágio do blastocisto e do touro utilizado na fertilização *in vitro* na proporção sexual (macho:fêmea) dos embriões. Desta maneira, pretende-se verificar a possibilidade de alterar a proporção macho:fêmea pela seleção do blastocisto e do touro utilizado na FIV, o que seria interessante para núcleos de seleção que fazem uso da produção *in vitro* de embriões.

3.3. Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore

O Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore - Nelore Brasil (PMGRN) foi criado em Junho de 1988, e atualmente, agrupa informações de 559 rebanhos, 5,0 milhões de pesagens, 874 mil medidas de perímetro escrotal e 1,7 milhão de animais na matriz de parentesco (LÔBO *et al*, 2011). Tais informações vêm sendo utilizadas na busca de soluções para aumento da produtividade da pecuária de corte brasileira. Dentre os vários objetivos do Programa está o uso de novas biotecnologias, tais como a Fecundação *in vitro*, como ferramentas poderosas para manipulação e multiplicação de genótipos superiores (LÔBO, 1992).

O PMGRN – Nelore Brasil conta com o suporte técnico, dentre outros, do Laboratório de Micromanipulação de Embriões e Molecular (LMEM), pertencente ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP), onde são desenvolvidas pesquisas relacionadas às biotecnologias aplicadas a bovinos, tais como, processamento *in vitro* de embriões, expressão gênica e utilização de marcadores moleculares.

Este laboratório realiza desde 1989, trabalhos de pesquisa com o processamento *in vitro* de embriões e tecnologias de DNA, com resultados satisfatórios tanto na pesquisa como na aplicação de técnicas de: Produção *in vitro* de Embriões (WATANABE, 1998; ACCORSI, 2001; ELIAS, 2003; ZERBINI, 2005), Detecção de Marcadores Moleculares - QTL's (BIASE, 2003), Técnicas de DNA Mitocondrial (GUNSKI, 2002), Métodos de Hibridação *in situ* fluorescente - FISH (GAVIO, 2000), criopreservação (FERNANDES, 2003) e biópsia embrionária (ELIAS, 2007).

3.3.1. Avaliação das características reprodutivas

Uma importante atividade desenvolvida pelo LMEM tem sido a avaliação da fertilidade de touros jovens da Reprodução Programada (RP). A RP do PMGRN – Nelore Brasil tem como premissa pontos importantes para o Melhoramento Genético de Bovinos, dentre esses, reduzir o intervalo de gerações, proporcionando oferta de touros jovens nas Centrais de Inseminação Artificial (LÔBO *et al.*, 2003).

A RP seleciona machos jovens (idade entre 18 e 36 meses) identificados pelo Mérito Genético Total (MGT) como animais geneticamente superiores, por meio da avaliação genética e capacidade de produzir sêmen com qualidade. Esses touros devem ser utilizados em uma parte das fêmeas de rebanhos participantes do PMGRN – Nelore Brasil. Desta maneira, estarão disponíveis nas avaliações subseqüentes destes animais, informações de maior valor para exatidão na predição do valor genético: as informações de suas progênes. Estas progênes, como média, terão valores genéticos mais altos e passarão a fazer parte destes rebanhos com grande antecipação, condicionando um progresso genético acelerado e de custo reduzido para os participantes. Para os rebanhos participantes do PMGRN que utilizam touros jovens, a conseqüente redução do intervalo de gerações (definido com a idade média dos pais quando nascem os descendentes), acelera o ritmo de ganho genético anual e colocam-nos à frente dos demais rebanhos (Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores [ANCP], 2006).

São várias as características reprodutivas analisadas em um Programa de Melhoramento Genético, dentre elas podemos citar a avaliação do sêmen quanto à patologia espermática, motilidade e concentração dos espermatozóides, teste de libido, perímetro escrotal, entre outras. Todavia, todas essas características não garantem, na totalidade, o êxito da fecundação dos espermatozóides de touros considerados férteis. Novas tecnologias estão sendo empregadas na avaliação de reprodutores, como por exemplo, a morfologia e a integridade do acrossoma, capacidade de sofrer reação acrossomal, a taxa de fecundação *in vitro* e a capacidade do zigoto em desenvolver até o estágio de blastocisto, além da presença de fatores no plasma seminal que podem influenciar na fertilidade dos machos estudada por Peripato (1987). A relação entre fertilidade do sêmen bovino, fecundação *in vitro* e reação acrossomal, verificada por Watanabe (1998) foi favorável, indicando que estes testes laboratoriais podem ser utilizados como parâmetros de fertilidade na seleção de touros.

A fertilidade de touros pode ser definida como o sucesso do espermatozóide em fecundar o oócito, resultando na formação do zigoto, seguindo o desenvolvimento embrionário e fetal até o nascimento, onde esta fertilidade *in vivo* apresenta uma variação entre touros, a qual se apresenta de forma semelhante *in vitro* (EID; LORTON; PARRISH, 1994; SAACKE; NADIR; NEBEL, 1994).

Essas diferenças são devido a fatores intrínsecos do espermatozóide, os quais são selecionados durante seu trajeto no trato reprodutivo feminino, até alcançar o sítio de fecundação. Ocasionalmente, os espermatozóides com alterações morfológicas ou funcionais podem penetrar no oócito. No entanto, este zigoto não seguirá um desenvolvimento embrionário normal.

Assim, um método adequado de verificar a fertilidade de touros pode ser efetuado mediante a fecundação *in vitro*, onde se detectaria espermatozóides de touros com baixa fertilidade. Estes resultados observados na fertilidade *in vitro* entre touros consideram a habilidade do espermatozóide em fecundar o oócito e o zigoto continuar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990). Sendo, portanto, de grande interesse para a pecuária a aplicação da FIV como critério de seleção para a fertilidade, pois este teste é mais vantajoso, considerando o custo e o tempo gastos, se comparado aos métodos tradicionais, onde se avalia a fertilidade dos touros baseados na taxa de nascimento mediante a inseminação artificial.

O uso da fertilização *in vitro* na avaliação de fertilidade em touros tem sido baseada em trabalhos onde foi possível constatar a associação entre a fertilidade a campo e *in vitro*, com uma correlação altamente significativa entre estas duas características (MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990). De qualquer forma, a fertilização *in vitro* pode ser utilizada ainda como um critério de seleção de touros jovens mediante a potencialização dos mesmos para a produção *in vitro* de embriões, possibilitando assim a identificação precoce de touros de alta fertilidade (ACCORSI, 2001).

A análise das características quantitativas na base de dados do programa Nelore Brasil é feita por meio de um cálculo onde é possível estimar o quanto o animal pode contribuir na sua progênie em relação à média das outras progênies para uma dada característica e com valor de acurácia associado, esta estimativa é chamada de Diferença esperada na progênie (DEP) e é dada na unidade da característica avaliada.

Assim, a DEP prediz a habilidade de transmissão genética de um animal avaliado como progenitor, podendo ser um valor negativo ou positivo que é gerada a cada avaliação genética do programa Nelore Brasil.

As avaliações genéticas das raças participantes do Programa Nelore Brasil são realizadas por meio da metodologia de modelos mistos, sob modelo animal. Esta metodologia permite a utilização de todas as informações disponíveis sobre o animal, de suas progênes e de seus parentes (diretos e colaterais). Além disso, possibilita a obtenção dos melhores preditores não viesados (BLUP) das DEPs de cada animal, para cada característica avaliada (LÔBO *et al*, 2011).

As DEPs de Reprodução são: Probabilidade de parto precoce (D3P), Idade ao primeiro parto (DIPP), Perímetro escrotal aos 365 dias e 450 dias (DPE 365 e DEP450, respectivamente), Período de gestação (DPG), Produtividade acumulada (DPAC) e *Stayability* (DSTAY). As DEPs de crescimento são: Peso ao nascer (DPN), Maternal para peso aos 120 dias (MP120), Peso aos 120 dias, 365 dias e 450 dias (DP120, DP365 e DP450, respectivamente). Existem ainda, as DEPs de ultrassonografia e morfológicas. (LÔBO *et al*, 2011).

Material e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Colheita de oócitos e Maturação *in vitro*

Os ovários foram coletados de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico e armazenados previamente em solução salina 0,9% estéril e recipiente térmico a 35°C para transporte até o Laboratório de Micromanipulação de Embriões e Molecular (LMEM). Chegando ao laboratório, os ovários foram lavados e armazenados em nova solução salina a 35°C e em seguida, seus folículos de tamanho 2-8mm foram aspirados utilizando uma seringa de 10ml acoplada a uma agulha de calibre 18G e o líquido folicular foi depositado numa Placa de Petri para a procura de oócitos sob estereomicroscópio.

Os oócitos selecionados foram aqueles que apresentavam três ou mais camadas do cumulus compacta e citoplasma homogêneo sem granulações (figura 1), portanto de grau 1, segundo Unceia (1998).

Figura 1. Complexos cumulus oócitos aspirados de folículos ovarianos.

Em seguida, os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de Lavagem (TCM199 com sais de Earles, glutamina, NaHCO_3 e Hepes suplementado com piruvato-22 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina-50 $\mu\text{g/ml}$, 10% de Soro Fetal Bovino) e, posteriormente,

lavados duas vezes em meio de Maturação (TCM199 com sais de Earles, glutamina, NaHCO_3 e suplementado com piruvato-22 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina-50 $\mu\text{g/ml}$, 10% de Soro Fetal Bovino, FSH-0,5 $\mu\text{g/ml}$, LH-50 $\mu\text{g/ml}$ e estradiol-1 $\mu\text{g/ml}$).

Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram maturados (figura 2) em microgotas de 100 μl de meio de Maturação cobertas com óleo mineral nas quais foram colocados 20 oócitos/microgota e levados à incubadora a 38,7°C, 5% de CO_2 em ar e com máxima umidade, durante 24h.

Figura 2. Complexo *cumulus* oócitos após 24h de maturação *in vitro*

4.2. Seleção de espermatozóides e ajuste da concentração espermática

As palhetas de sêmen dos touros avaliados foram descongeladas no sistema de “banho-maria” a 35°C, durante 30 segundos, e o conteúdo submetido à técnica de gradiente Percoll para a obtenção de espermatozóides viáveis, além da remoção do diluidor do sêmen e do plasma seminal. Para tanto, o sêmen de uma palheta foi depositado sobre o gradiente de Percoll com concentrações de 45% e 90% (2ml: 2ml) preparado com o meio de lavagem de espermatozóide TALP – Sêmen (Anexo I) e submetido à centrifugação por 30 minutos a 342g/minuto. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o pelete avaliado quanto à concentração espermática e motilidade, retirando-se duas amostras de 5 μl as quais foram diluídas em 250 μl de água e 250 μl de meio de Fecundação (10ml de Estoque de FIV- Anexo I- suplementado com heparina-10 $\mu\text{g/ml}$, piruvato-22 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina-50mg/ml, BSA sem

ácidos graxos-6mg/ml e Solução PHE-2 μ M de penicilina, 1 μ M de hipotaurina e 0,25 μ M de epinefrina), respectivamente.

A taxa de motilidade espermática foi obtida sob visualização em microscópio e a quantidade de espermatozóide por meio da contagem do número de espermatozóides nos 5 quadrantes maiores da Câmara de Neubauer. O ajuste final da concentração espermática foi feito pela adição de um volume de meio FIV ao pelete obtido pela equação:

$$VA = (VP \times M/1000 \times CE) - VP$$

Onde:

VA = Volume de meio FIV adicionado ao pelete (μ l)

VP = Volume do pelete (μ l)

M = Motilidade (0 a 100)

CE = Contagem de espermatozóides na Câmara de Neubauer

4.3. Capacitação espermática e fecundação *in vitro*

Para a indução da capacitação espermática, foram adicionados 10 μ l de solução de espermatozóides, previamente ajustada, as microgotas de 90 μ l de meio de fecundação cobertas com óleo mineral, para obtenção de uma concentração final de 2 milhões de espermatozóides por ml.

Após 15 minutos de capacitação, os oócitos supostamente maduros (no estágio da Metáfase da segunda Meiose) foram transferidos para as microgotas da placa de fertilização. Os espermatozóides e os oócitos permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,7°C durante 12 horas.

4.4. Cultivo *in vitro*

Após o período de incubação, os supostos zigotos foram lavados e submetidos à pipetagem em meio FIV para retirar o excesso de células do cumulus e os espermatozóides aderidos, restando em torno de três camadas de células do cumulus aderidas à zona pelúcida. Os

zigotos foram co-cultivados com monocamadas de células do cumulus em microgotas de 50µl de meio de cultivo (meio CR2, Anexo I, adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino, albumina sérica bovina, aminoácidos e gentamicina – 50mg/ml) cobertas com óleo mineral por 168 horas após o início da Fecundação *in vitro* sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,7°C.

4.5. Classificação dos embriões viáveis

Após 168h da FIV (sétimo dia de cultivo *in vitro*), o número de embriões viáveis foi avaliado e os embriões classificados. Foram considerados embriões viáveis as estruturas que se encontravam nos estágios de desenvolvimento: Blastocisto inicial (blastocisto iniciando o processo de cavitação sendo que a cavidade ocupa menos da metade do volume total do embrião), Blastocisto (cavidade sendo expandida e ocupando metade ou mais do volume total, está ocorrendo redução do botão embrionário), Blastocisto expandido (zona pelúcida delgada, botão embrionário reduzido em relação à cavidade expandida) e Blastocisto eclodido (blastocisto parcialmente ou totalmente fora da zona pelúcida).

Figura 3. Blastocistos viáveis ao sétimo dia de desenvolvimento após a fertilização *in vitro*.

4.6. Sexagem dos embriões

Cada embrião selecionado foi depositado em solução de 2µl de PBS em microtubos. Os microtubos contendo os embriões sofreram choque térmico em nitrogênio líquido por 5 segundos, duas vezes, para rompimentos das membranas celulares e foram

armazenados à -20°C para posterior sexagem. Para a reação em cadeia de polimerase (PCR) foram adicionados aos microtubos com embriões: 18,25µl de H₂O, 2,5µl de tampão (10X), 0,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTP (10mM), 0,9 µl de *primer* cromossômico Y-específico (10µM) e 0,25µl do *primer* específico bovino (10 µM) e 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen, San Diego, EUA). Os *primers* para amplificação dos *loci* dos genes Y específico e autossômico bovino para a sexagem foram escolhidos segundo o protocolo de Wrenzycki *et al* (2002) e estão descritos na tabela 1. O ciclo utilizado no termociclador para realização da PCR, foi de 97°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 75°C por 45 segundos, e após as 35 repetições, 72°C por 5 minutos, finalizando a reação. A visualização dos fragmentos de PCR foi feita em gel de agarose 3% com brometo de etídeo, por meio de eletroforese (Figura 4).

Tabela 1. Primers usados na PCR para transcritos de embriões bovinos.

Genes	Sequência do <i>primer</i> e posição	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Y-específico bovino	5' CCTCCCCTTGTCAAACGCCCGGAATCATT 3' TGCTTGACTGCAGGGACCGAGAGGTTTGGG	210	PCT WO86/07095 (ELLIS & HARPOLD, 1986)
Autossômico específico bovino	5' AGGTCGCGAGATTGGTCGCTAGGTCATGCA 3' AAGACCTCGAGAGACCCTCTTCAACACGT	300	PCT WO86/07095 (ELLIS & HARPOLD, 1986)

Figura 4. Visualização dos fragmentos amplificados pela reação em cadeia de polimerase. O fragmento Y- específico apresenta tamanho de 210pb e o fragmento autossômico, 300pb. As amostras representadas pela letra M correspondem aos embriões do sexo masculino, enquanto que as amostras representadas pela letra F representam os embriões do sexo feminino.

4.7. Análise estatística

Para a análise do desenvolvimento de embriões totais por touro, a análise estatística foi processada pelo *Software Statistical Analysis Systems* (SAS, 2003) e os dados que estavam em proporções sofreram transformação pelo arco-seno da raiz-quadrada (DONNAY; LEESE, 2002 *apud* DAGNELIE, 1986). Em seguida, foi testada a normalidade por meio do Teste de Shapiro-Wilk, utilizando o comando NORMAL no procedimento GLM.

Para análise das proporções macho:fêmea por touro no desenvolvimento total de embriões obtidos por meio de fertilização *in vitro* e por fase do blastocisto foi realizado o teste T, considerando a proporção esperada de 1:1.

Para análise das proporções macho:fêmeas das progênes obtidas por inseminação artificial e monta natural foi realizado o teste do Qui-Quadrado considerando a proporção esperada de 1:1, com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram utilizados sêmen de 17 touros jovens pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore - Nelore Brasil (PMGRN) e um total de 2448 oócitos de vacas abatidas em matadouro. Foram obtidos, por meio da fertilização *in vitro*, um total de 886 embriões compreendidos nas fases de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido que foram sexados por meio de técnica de PCR. As doses de sêmen utilizadas eram da mesma partida, portanto, do mesmo ejaculado.

Além disso, os meios utilizados para maturação dos oócitos, seleção e capacitação do sêmen, fecundação micromanipulação e cultivo de embriões foram padronizados para todos os experimentos, segundo protocolo do Laboratório de Micromanipulação de Embriões e os touros foram avaliados em três réplicas seguidas de experimento, diminuindo ainda mais possíveis fontes de variações ambientais para verificar a repetição dos resultados.

5.1. Influência do touro no desenvolvimento e no sexo do embrião.

A análise estatística do desenvolvimento de embriões totais por touro, não encontrou variação entre as réplicas dos experimentos para cada touro, evidenciando a padronização da técnica de fertilização *in vitro* empregada, os meios de cultura utilizados e possíveis fatores de variação.

Nossos resultados a respeito da fertilidade *in vitro* dos 17 touros avaliados, entendida como a razão entre o número total de embriões desenvolvidos em relação ao número de oócitos, mostram que não existe variação ($p > 0,05$) entre touros em relação a esta característica (Figura 5), confirmando os achados de outros autores que também não verificaram esta diferença (ZERBINI, 2005).

Figura 5. Comparação entre a porcentagem de embriões desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo (número de embriões divididos pelo número de oócitos) por meio de fertilização *in vitro* entre 17 touros avaliados. A análise de variancia mostrou que nenhum touro apresentou diferença estatística para esta característica ($p>0,05$).

O fato destes animais serem touros jovens, selecionados pela sua capacidade de produzir sêmen com qualidade, pois pertencem ao projeto de Reprodução Programada (RP) poderia explicar, em parte, a ausência de variação entre eles em relação à fertilidade *in vitro*, ou seja, ao desenvolvimento total de embriões em relação ao número de oócitos, associada a padronização da técnica de produção *in vitro* utilizada, a utilização de oócitos de qualidade e minimização da interferência de fatores ambientais.

Os resultados obtidos dos touros jovens da RP são de grande importância para o PMGRN – Nelore Brasil, pois incrementam as informações já existentes a respeito da fertilidade desses animais, sendo, também, não menos importantes para os núcleos de seleção de bovinos que utilizam esses animais no sistema de produção *in vitro* de embriões, obtendo o conhecimento prévio do desempenho *in vitro* destes animais.

A característica de fertilidade *in vitro* de um touro pode ser um critério de seleção no momento da escolha do reprodutor a ser utilizado para a produção *in vitro* (PIV) de embriões, ou, até mesmo, uma forma de pré-avaliar a fertilidade de machos jovens que iniciarão a vida reprodutiva fazendo parte de programas de transferência de embriões ou produção *in vitro*, como no caso da RP do PMGRN-Nelore Brasil.

No entanto, a utilização de biotecnologias da reprodução como a fertilização *in vitro* exige cuidados a fim de se evitar aumento da endogamia, de animais com características não desejáveis, de baixo valor genético e diminuição da variabilidade genética, pois proporcionam um rápido aumento do rebanho em um curto intervalo de tempo (ELIAS, 2007).

A produção total de embriões para cada touro não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) em relação à proporção macho:fêmea (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com os de Madrid-Bury *et al.* (2003), que não observaram diferença entre a proporção macho:fêmea de embriões bovinos produzidos *in vitro*. No entanto, este autor não separou os embriões ao sétimo dia de cultivo nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, o que realizamos neste trabalho. Outros trabalhos tem mostrado variação entre touro em relação à proporção dos sexos de embriões desenvolvidos *in vitro* e a cinética do desenvolvimento embrionário (ALOMAR *et al.*, 2008).

São vários os fatores que influenciam nos sistemas de cultivo *in vitro* de embriões favorecendo o desvio da proporção macho:fêmea, entre eles, o método de preparação do espermatozóide para a fertilização *in vitro*, a utilização do soro fetal bovino (SFB), o tempo de incubação entre oócito e espermatozóide e fontes de energia.

O gradiente de Percoll tem sido o método largamente utilizado para a preparação do sêmen bovino para fertilização *in vitro* e tem sofrido alterações ao longo dos anos, adequando-se as novas necessidades do mercado como a tecnologia do sêmen sexado. Nossos resultados também sugerem que o método de seleção e capacitação dos espermatozoides, método Percoll, não favorece um tipo de espermatozóide portador do cromossomo sexual Y ou X, estando de acordo com outros trabalhos (RHEINGANTZ *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2009) que verificaram a não influência do gradiente descontínuo de Percoll 90:45 sobre a proporção macho:fêmea dos embriões desenvolvidos.

Burgoyne (1993) verificou que o cromossomo Y carregava um fator que acelerava a taxa de desenvolvimento pré-implantacional e Kochhar *et al.* (2003) concluíram que o espermatozóide portador do cromossomo Y teria uma vantagem seletiva para períodos curtos de interação com os oócitos, como o período de 6 horas, e esta vantagem seria perdida a medida que se aumentava este período de co-incubação até 18 horas. Neste trabalho, foi utilizado o período de co-incubação entre espermatozoides e oócitos de 12 horas e este período não favoreceu o desenvolvimento de um dos gêneros de maneira significativa.

O fato de nosso sistema não utilizar um derivado da glicose - o piruvato - como substrato energético confirma os trabalhos de outros autores que verificaram o desvio sexual para machos em sistemas que utilizam a glicose como fonte de energia. Isto porque os embriões portadores do cromossomo Y apresentam uma vantagem em relação às fêmeas por metabolizarem com maior facilidade este tipo de substrato energético (TIFFIN *et al*, 1991).

Em relação ao SFB, os resultados obtidos em relação a sua interferência na proporção sexual macho:fêmea tem se mostrado contraditórios. Gilard *et al* (2004), assim como em nossos resultados, não constataram desvio na proporção entre os gêneros na presença do SFB ou da própria albumina sérica bovina. Por outro lado, anos antes, Gutierrez-Àdan *et al* (2001) verificaram um aumento significativo na população de embriões machos em relação as fêmeas.

Outro fator muito importante a ser discutido é o meio de cultura empregado no cultivo dos embriões *in vitro*. As diferenças na proporção macho-fêmea, alterada em 1:1 estão relacionadas sobre tudo às condições de cultivo impostas ao desenvolvimento de embriões (GUTIERREZ *et al.*, 2001). Os exemplos mais frequentes estão bem evidenciados nas taxas e velocidade de clivagem nos primeiros dias de cultivo que favorecem os embriões do sexo masculino. Esta característica é amplificada quando da seleção de blastocistos para transferência ao sétimo dia de cultivo (BREDBACKA *et al.*, 1996; AVERY *et al.*, 1989). Os sistemas e meios de cultivo podem favorecer o crescimento de embriões masculinos em detrimento de embriões femininos.

Há relatos na literatura que os meios Menezo's e B2 contribuem para um maior desenvolvimento de embriões machos, enquanto que o TCM não parece interferir na proporção sexual (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001). Nossos resultados sobre a proporção sexual em sistemas de cultivo utilizando o meio CR2 são os primeiros resultados apresentados na literatura e sugerem que este meio não altera esta relação entre desenvolvimento de embriões machos e fêmeas.

Tabela 2. Proporção sexual de embriões totais bovinos ao sétimo dia após a fertilização *in vitro* de 17 touros por meio de fertilização *in vitro*.

Touro	Machos:fêmeas (%)	Embriões sexados
1	26:35 (43:57)	61
2	24:18 (57:43)	42
3	25:16 (61: 39)	41
4	36:30 (54: 46)	66
5	20:30 (40:60)	50
6	22:22 (50:50)	44
7	35:31 (53:47)	66
8	17:19 (47: 53)	36
9	28:25 (53:47)	53
10	30:27 (53: 47)	57
11	38:27 (58: 42)	65
12	25:31 (45: 55)	56
13	17:27 (39: 61)	44
14	23:24 (49: 51)	47
15	20:20 (50:50)	40
16	29:23 (56:44)	52
17	39:27 (59:41)	66
Total	454:432 (51:49)	886

Os embriões totais compreendem a soma de todas as fases do blastocisto (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido).

5.2. Influência do touro e do estágio do blastocisto na proporção sexual

Diversos estudos *in vitro* de espécies tais como bovinos, ovinos, macacos, porcos e humanos mostraram que os machos progridem em alguns estágios do desenvolvimento mais rápidos que as fêmeas e consistem de um número maior de células que as fêmeas no estágio de blastocisto. Em bovinos, a proporção de machos é significativamente maior entre embriões que clivam ao estágio de 2 células dentro das 30 primeiras horas após a fertilização (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001). O início e a duração da fase de replicação do DNA são afetados por diversos fatores regulados paternalmente e a duração da fase S está correlacionada ao potencial de futuro desenvolvimento embrionário (COMIZZOLI *et al*, 2000).

A exposição prolongada de oócitos e espermatozóides tem efeito negativo na fertilização e no desenvolvimento embrionário, pois gera uma quantidade excessiva de espécies reativas ao oxigênio na cultura que envolve a peroxidação de ácidos poliinsaturados nas membranas celulares reduzindo sua fluidez e flexibilidade necessária para a fusão oócito – espermatozóide e subsequente qualidade de desenvolvimento do embrião (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

Dos 17 animais avaliados em nosso trabalho, 3 touros (touro 5, touro 9 e touro 13) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no desenvolvimento de blastocisto inicial com o desvio sexual voltado para fêmea, e o touro 15 apresentou desvio para macho, conforme pode ser visto na Figura 6.

Figura 6. Comparação entre o número de blastocisto inicial desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea voltado para fêmea. ^a = atribuído ao valor $p < 0,05$, para a proporção esperada de 1:1. ^b = atribuído ao valor $p < 0,01$, para a proporção esperada de 1:1.

Uma possível explicação para o comportamento do touro 15 poderia ser relacionada a uma característica intrínseca do espermatozóide Y deste animal apresentando menor cinética do desenvolvimento embrionário *in vitro*, como discutido anteriormente.

Foi verificado desvio sexual significativo ($p < 0,01$) para fêmea na fase de blastocisto inicial ao analisarmos o desenvolvimento total de embriões, conforme mostra a Figura 7.

Figura 7. Comparação entre o número de blastocisto inicial desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea voltado para fêmea. ^a = atribuído ao valor $p < 0,01$, para a proporção esperada de 1:1.

Estes dados nos sugerem que existe uma variação entre touros para o desenvolvimento de embriões fêmeas no estágio de blastocisto inicial o que pode ser um critério de seleção na hora da escolha do reprodutor para o acasalamento *in vitro*, pois em rebanhos com interesse econômico em fêmeas, como rebanhos leiteiros, esta característica é de extrema importância na hora da seleção dos embriões para transferência em receptora, tendo em vista que os laboratórios tem priorizado estágios mais avançados de blastocisto.

Em relação à proporção macho:fêmeas em blastocisto, nenhuma diferença significativa foi constatada ($p > 0,05$) entre os touros, conforme vemos na Figura 8, bem como para o desenvolvimento de embriões totais para esta fase de blastocisto com vemos na Figura 9.

Figura 8. Comparação entre o número de blastocisto machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros não apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea com valor $p > 0.05$, em relação à proporção esperada de 1:1.

Figura 9. Comparação entre o número de blastocisto total machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros não apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea, com valor $p > 0.05$, em relação à proporção esperada de 1:1.

Quatro touros apresentaram desvio significativo da proporção macho:fêmea voltado para macho na fase de blastocisto expandido; são os touros: 7, 9, 11 e 16, e dois touros (touros 1 e 12) apresentaram desvio significativo para fêmea, conforme podemos ver na Figura 10, esta fase de blastocisto também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com desvio sexual de seus embriões com tendência a macho, conforme mostra a Figura 11.

Figura 10. Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea. ^a = atribuído ao valor $p < 0.01$, para a proporção esperada de 1:1. ^b = atribuído ao valor $p < 0.05$, para a proporção esperada de 1:1.

O fato dos touros 1 e 12 apresentarem desvios da proporção macho:fêmeas para fêmea sugerem uma maior vulnerabilidade dos espermatozóide Y nas condições de cultivo *in vitro* ou até mesmo devido ao período de 12 horas de incubação entre oócitos e espermatozoides, como relatado por Alomar *et al* (2008) em seu trabalho.

Vale notar também que o touro 9 que apresenta maior desenvolvimento de embriões machos na fase de blastocisto expandido, apresentou maior desenvolvimento de embriões fêmeas na fase de blastocisto inicial, estando de acordo com nossa hipótese de que os estágios mais avançados de blastocisto são, em maior parte, constituídos por machos,

enquanto que os estágios mais atrasados do blastocisto são formados, em maior parte, por embriões fêmeas.

A análise das figuras de desenvolvimento total de blastocisto expandido por touro insinua que alguns touros apresentariam diferenças na proporção macho:fêmea, no entanto, vale ressaltar que estes animais, ao longo das três réplicas experimentais, não repetiram a proporção sexual dos seus embriões, assim, a análise estatística não resultou em diferença significativa.

Figura 11. Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea voltado para macho. ^b = atribuído ao valor $p < 0.05$, para a proporção esperada de 1:1.

Para a fase de blastocisto eclodido, nenhum touro apresentou diferença significativa ($p > 0.05$) em relação à proporção sexual (Figura 12).

Porém, vale ressaltar a pouca quantidade de embriões que se desenvolveram até esta fase do blastocisto, no entanto, esta fase de blastocisto eclodido apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) para o desenvolvimento maior de embriões machos, na sua totalidade, conforme mostra a Figura 13, corroborando com a idéia de que os embriões machos encontram-se em estágios mais avançados.

Figura 12. Comparação entre o número de blastocisto eclodido machos e fêmeas desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros não apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea com valor $p > 0.05$, em relação à proporção esperada de 1:1.

Figura 13. Comparação entre o número de blastocisto expandido macho e fêmea desenvolvidos ao sétimo dia de cultivo entre 17 touros pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, por meio da técnica de fertilização *in vitro*. O teste T mostrou que os touros apresentaram diferença estatística para o desvio da proporção macho:fêmea voltado para macho ($p < 0.01$). ^a = atribuído ao valor $p < 0.01$, para a proporção esperada de 1:1.

Essas diferenças encontradas podem ser atribuídas, em maior parte, ao efeito do touro devido, pois os oócitos selecionados foram os de grau I e de folículos de 2 - 8mm visíveis na periferia dos ovários; segundo Pavlock; Lucas-Hahn; Niemann (1992), oócitos dessa origem têm igual potencial de desenvolvimento, minimizando dessa maneira o efeito materno.

Além disso, verificou-se, pela avaliação do estágio morfológico do embrião ao sétimo dia de cultivo, variação entre touros, que somente são possíveis de serem analisadas após o desenvolvimento do embrião ao estágio de blastocisto, e de acordo com Lonergan (1994), os espermatozoides mostram diferenças qualitativas que são reveladas somente quando o embrião avança ao estágio de blastocisto.

Estes resultados sugerem que a variação entre touros parece não estar na fase intermediária do blastocisto, mas sim, nas fases extremas, como no blastocisto inicial, ou avançada, como no blastocisto expandido, durante o seu desenvolvimento.

Contudo, os dados obtidos neste trabalho explicam, em parte, o maior nascimento de animais machos obtidos pela técnica de fertilização *in vitro*, tendo em vista que o estágio de blastocisto expandido é o preferido para transferência a campo pelos técnicos, por apresentar os melhores índices de prenhez (DAYAN *et al*, 2002) e corrobora para hipótese de outros autores que sugeriram o grande nascimento de machos a seleção de embriões em estágios mais avançados (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

Nossos resultados confirmam a hipótese de que a seleção de blastocistos com desenvolvimento mais avançados para transferência em receptoras favorecem a seleção de machos. Assim, o momento da seleção dos embriões pode alterar a proporção sexual dos nascimentos após transferência, na medida que quanto mais cedo a seleção dos embriões, maior a probabilidade de transferir embriões machos em um número maior do que fêmeas, pois a maior parte dos primeiros blastocistos a serem formados é constituída do sexo masculino.

Assim, uma seleção mais tardia, permitiria que os embriões fêmeas, em maior parte, concentrados na fase inicial de blastocisto, se desenvolvessem até estágios mais avançados e pudessem ser transferidos com maior probabilidade de gerarem uma prenhez.

O tempo de clivagem dos embriões bovinos tem sido um valor de predição para a formação do blastocisto e viabilidade do embrião (KOCCHAR, PEIPPO & KING, 2001).

Alomar *et al* (2008) verificou que o tempo de formação do pronúcleo após a fertilização e da ocorrência da primeira clivagem tem relação com o desenvolvimento dos gêneros, de modo que embriões machos são mais rápidos neste eventos comparados aos embriões fêmeas.

Uma importante observação a ser feita a partir dos nossos resultados é que os touros que apresentaram maior desenvolvimento significativo de fêmeas em grande maioria, não são os mesmos que apresentaram o desenvolvimento significativo de machos. Parece, então, que os touros podem apresentar uma tendência em produzir mais fêmeas ou mais machos, o que pode ser uma característica de grande aproveitamento econômico para núcleos de seleção que fazem uso da tecnologia da produção *in vitro* de embriões.

Dada a grande quantidade de fatores que podem alterar a proporção sexual, é importante salientar que nossos resultados devem estar sempre relacionados ao protocolo e meios de cultura utilizados, assim como a qualidade morfológica do oócito, assim como todos os trabalhos que estudam desvio sexual de embriões *in vitro*.

Nossos resultados sugerem que os embriões fêmeas estão concentrados nas fases mais jovem do blastocisto (blastocisto inicial), enquanto que o embriões machos encontram-se nas fases mais avançadas (blastocistos expandidos). Estes achados têm uma grande importância se considerarmos que o sucesso de prenhez depende, dentre outros fatores, da qualidade e do estágio de desenvolvimento em que o embrião se encontra no momento de transferência para receptora (HASLER, 1995).

Em 2002, Dayan *et al.* verificou que embriões transferidos no estágio de blastocistos expandidos apresentavam os melhores resultados de prenhez, enquanto que embriões transferidos nos estágios de blastocistos eclodidos, blastocistos e blastocistos iniciais apresentam resultados inferiores. Isto talvez possa explicar a tendência de nascimentos de mais machos na produção *in vitro* de embriões a campo, já que o estágio de blastocisto expandido é o preferido para transferência de embriões.

Desta maneira, este trabalho contribui com o conhecimento a respeito da cinética do desenvolvimento, haja vista que a preocupação por parte dos selecionadores e pesquisadores em relação ao desvio da proporção sexual das progênes oriundas de embriões *in vitro* se faz pertinente, sendo que esta variável afeta a estratégia de seleção principalmente para selecionadores que buscam melhoramento genético por seleção de fêmeas de reposição.

5.3. A proporção sexual na progênie a campo

Os resultados obtidos pelo teste do Qui-quadrado a campo dos animais testados não apresentaram diferenças na proporção macho:fêmea para o nascimento de filhos por meio de Inseminação Artificial ($\chi^2 = 1$; graus de liberdade = 21,026) a campo ou Monta natural ($\chi^2 = 0,99$; graus de liberdade = 7,81) considerando o nível de significância de 5%, mostrados nas tabela 3 e 4, respectivamente, que chamamos de resultados *in vivo*. Desta maneira, nenhuma correlação foi possível de ser encontrada entre as proporções sexuais *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 3. Proporção sexual de filhos nascidos a campo por meio de Inseminação Artificial.

Touro	Machos: fêmeas (%)	Total de filhos
2	114:111 (51:49)	225
3	47:55 (46:53)	102
5	5:5 (50:50)	10
6	77:67 (53:47)	144
7	54:60 (47:53)	114
8	85:76 (53:47)	161
9	14:24 (37:63)	38
10	1187:1204 (50:50)	2391
11	20:17 (54:46)	37
12	15:15 (50:50)	30
14	60:51 (54:46)	111
15	34:34 (50:50)	68
16	65:40 (62:38)	105
Total	1777:1759 (50:50)	3536

Número de filhos machos e fêmeas nascidos a campo por meio da técnica de inseminação artificial de 16 touros jovens pertencentes ao projeto da Reprodução Programada do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore – Nelore Brasil. O teste do Qui-quadrado não mostrou alteração da proporção esperada 1:1 (valor de $\chi^2=1$ e graus de liberdade = 21,026).

Tabela 4. Proporção sexual de filhos nascidos a campo por meio de monta natural.

Touro	Macho:fêmea (%)	Total de filhos
2	1:0 (100:0)	1
7	4:5 (44:56)	9
10	22:21 (51:49)	43
15	12:9 (57: 42)	21
16	36: 40 (47:53)	76

Número de filhos machos e fêmeas nascidos a campo por meio de monta natural de 5 touros jovens pertencentes ao projeto da Reprodução Programada do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore – Nelore Brasil. O teste do Qui-quadrado não mostrou alteração da proporção esperada 1:1 (valor de $\chi^2=0,99$ e graus de liberdade = 7,81).

Nota-se que não foi possível obter os dados a campo de muitos touros o que pode ter prejudicado a análise estatística, pelo baixo conteúdo amostral. Estudos futuros com maior número de amostras poderão contribuir para novas análises que possam nos fornecer informações relevantes e possíveis associações com características *in vitro*.

Em bovinos, a Inseminação Artificial pode ser considerada uma das técnicas responsáveis pelo incremento da produtividade. O número crescente de rebanhos submetidos a programas de melhoramento genético e cruzamento industrial, que tem tido crescimento expressivo desde 1989, é que permitiu que a utilização da Inseminação Artificial apresentasse um crescimento de 350% nos últimos 10 anos (HOSSIPIAN DE LIMA, 2007).

Silva *et al* (2008) verificaram que o momento da inseminação artificial exercia influência sobre a relação macho : fêmea, aumentando a proporção de machos na medida em que as inseminações são realizadas mais tardiamente. Nossos dados são gerais, referentes à base de dados de todas as fazendas que utilizaram estes animais em sua estação de monta utilizando a técnica de inseminação artificial, não sendo possível estabelecer a influência do tempo em que as inseminações aconteceram.

Pode ser o processamento diferencial e preferencial do espermatozóide portador de X ou Y no trato reprodutivo da fêmea ou *in vitro* que faz machos iniciarem o desenvolvimento mais cedo que as fêmeas. Assim, o tempo de inseminação ou acasalamento

no ciclo de cada animal ou a interação gamética *in vitro* pode afetar o processo de fertilização dando a um sexo a vantagem de desenvolvimento em relação a outro, assim, a proporção sexual dependeria do estado de maturação do oócito e da cinética de interação entre o esperma e o oócito (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

Os resultados obtidos estão de acordo com a proporção sexual de aproximadamente 1:1 entre nascimentos de bezerros e embriões produzidos *in vivo*. Assim, nas condições *in vivo*, os espermatozóides presentes no ejaculado precisam percorrer uma longa distância no trato reprodutivo da fêmea e somente uma minoria deles atingem o oócito. No entanto, as interações complexas que acontecem entre o gameta masculino e o ambiente uterino parece não favorecer o espermatozóide portador do cromossomo Y ou X (IWATA *et al.*, 2008).

5.4. Proporção sexual e características quantitativas do melhoramento genético.

A fertilização de oócitos de mamíferos estabelece o sexo do embrião e dá início a uma cascata de eventos que conduzirá a diferenciação sexual. Um número aproximadamente de machos e fêmeas é nascido, com os machos geralmente pesando mais do que as fêmeas. Diferentes pesos ao nascimento têm sido associados às taxas de crescimento pré-natal diferenciais sob a influência do ambiente hormonal sexo específico do feto (KOCCHAR; PEIPPO & KING, 2001).

A correlação entre perímetro escrotal (PE) e características quantitativas e qualitativas de sêmen em touros jovens é positiva (VALE FILHO, 1988). Além disso, a medida do PE está ligada à idade à puberdade em machos e fêmeas, sendo por isso recomendada sua inclusão em programas que visem melhorar a eficiência reprodutiva (MARTIN *et al.*, 1992; BERGMANN *et al.*, 1996). O peso corporal é importante fator que influi nas medições do PE (COULTER & BAILEY, 1988). Lôbo *et al.* (1994) e Bergmann *et al.* (1996) encontraram correlação genética positiva entre PE e pesos na raça Nelore.

Em nosso trabalho, foi encontrada correlação ($r = 0,60$; $p < 0,05$) apenas com os valores da Diferença Esperada na Progenie de peso aos 120 dias após o nascimento (DEP120), no entanto, um número maior de animais precisam ser avaliados para uma maior acurácia destes resultados. O que poderíamos sugerir é uma relação indireta com a fertilidade, tendo em vista que o peso tem correlação com a fertilidade e o início da vida reprodutiva,

assim, animais mais precoces teriam uma tendência a produzir maior quantidade de machos em relação às fêmeas.

Além disso, o baixo número de dados obtidos destes animais por monta natural não nos permitiu avaliar de maneira eficiente a proporção macho:fêmea para este tipo de reprodução.

Deste modo, este trabalho contribuiu com novas informações a respeito da cinética do desenvolvimento do embrião no estágio de blastocisto ao sétimo dia de cultivo *in vitro* e de progênes a campo obtidas por Inseminação artificial ou Monta Natural e suas relações com a proporção sexual, além de incrementar as informações dos animais participantes do PMGRN- Nelore Brasil. Novos trabalhos precisam ser realizados a fim de elucidar as razões do desvio sexual, sobretudo, às características intrínsecas do espermatozóide, a fim de fornecermos ferramentas adicionais para a seleção genética de rebanhos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os touros avaliados neste trabalho apresentaram similaridade quanto à fertilidade *in vitro*, ou seja, não apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento de embriões totais viáveis ao sétimo dia de cultivo *in vitro* em relação ao número de oócitos fertilizados que pudessem ser aplicadas como um critério de seleção.

Os touros avaliados neste trabalho desenvolveram, em sua totalidade, embriões machos e fêmeas na mesma quantidade não apresentando sobrevivência preferencial de um dos sexos.

Os touros apresentaram desenvolvimento preferencial de fêmeas em relação ao desenvolvimento de blastocisto inicial, ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, o que pode ser um critério de seleção na escolha do acasalamento para produção *in vitro* de embriões

O estágio de blastocisto inicial ao sétimo dia de cultivo *in vitro* apresenta um maior desenvolvimento de embriões fêmeas em relação aos machos, o que pode ser um critério de seleção do embrião para transferência em receptora, principalmente para núcleos de seleção com interesse na reposição de fêmeas.

Os touros apresentaram desvios da proporção macho:fêmea de 1:1 em relação ao desenvolvimento de blastocisto expandido ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, o que pode ser um critério de seleção na escolha do acasalamento para produção *in vitro* de embriões.

O estágio de blastocisto expandido ao sétimo dia de cultivo *in vitro* apresenta maior desenvolvimento de embriões machos em relação às fêmeas, o que pode ser um critério de seleção do embrião para transferência em receptora, principalmente para núcleos de seleção com interesse na venda de machos.

O estágio de blastocisto eclodido ao sétimo dia de cultivo *in vitro* apresenta maior desenvolvimento de embriões machos em relação às fêmeas, desviando significativamente da proporção esperada de 1:1.

Os touros não apresentaram desvio da proporção macho:fêmea de 1:1 em sua progênie obtida a partir da técnica de reprodução de Inseminação Artificial.

Há correlação positiva entre a proporção macho:fêmea e a DEP120.

A seleção de embriões para transferência em receptora em estágios mais avançados tende a selecionar, em sua maioria, embriões do sexo masculino.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, M. F. Avaliação da fertilidade de touros do PMGRN-USP por meio da técnica de produção *in vitro* de embriões 35p.; 2001. Monografia (Trabalho de conclusão) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

ALMEIDA, G.P., ALVAREZ, R.H. Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. **B. Industr. Animal.** v.6, n.2, p.185-196, 2003.

ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters oh six bulls showing different abilities to promote embryo development *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.** V.18, 395-402, 2008.

ALONSO, R.V.; HELLU, 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. **Acta Scientiae Veterinariae** v.34 (suplemento 1), p.440, 2006.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE CRIADORES E PESQUISADORES [ANCP]. Ribeirão Preto. Disponível em http://www.ancp.org.br/tecno_reprod.asp. Acesso em 21 out. 2006.

AVERY, B, BACK, A AND SCHMIDT T. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 32, p.139-47 , 1989.

AVERY, B.; JORGENSEN, C.B.; MADISON, V. GREVE,T. Morphological development and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 32, p.265-270, 1992.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.S.; KANDI, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v.15, p. 355–367. 2007.

BAVISTER, B.D. The early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, v.124, p.181-196. 2002.

BERGMANN, J.A.G., ZAMBORLINI, L.C., PROCÓPIO, C.S.O. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, p.69-78, 1996.

BIASE, F. H., MARTELLI, L. R., ROSA, A. J. M., NUNES, F. M. F., GARNERO, A. V., GUNSKY, R. J., BEZERRA, L. A. F., LOBO, R. B. New Allele For Pit 1 Locus In Nellore Cattle Breed (Bos Indicus) In: 7th World Congress On Genetics Applied To Livestock

Production, 2002, Montpellier. **Proceedings Of The 7th World Congress On Genetics Applied To Livestock Production**. Inra - France: Cirad, v.31. p.475–478, 2002.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, 68S, S147–S155, 2007.

BREDBACKA, K.; BREDBACK, P.; Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.106,p. 169-172, 1996.

BURGOYNE, P.S. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. **Development**, v. 117, p. 341-345. 1993.

COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Onset of the first S-phase is determinated by a Paternal Effect during the G1-phase in Bovine Zygotes. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 1677-1684, 2000.

COULTER, G.H., BAILEY, D.R.C. Testicular development of Salers bulls to one year age. **Can. J. Anim. Sci.**, v.68, p.961-964, 1988.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; FERRAZ, M.L.; MEIRELLES, F.V.; WATANABE, Y. F. Influence of the Embryo Stage, Development Kinetics and Recipient Synchronization on Pregnancy Rates of OPU-IFV Embryos. **Theriogenology**, 492p, v.57, 2002.

DE SOUZA, P. A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A.; BILODEAU-GOESEELS,S. Oogenetic and zygote gene expression directing early bovine embryogenesis. **Mol. Reprod. Dev**, v.51,p. 112-121, 1998.

DING, X.; WANG, Y.; ZHANG, D.; WANG, Y.; GUO, Z.; ZHANG, Y. Increased preimplantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'- deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 622-630, 2008

DONNAY, I.; LEESE, H.J. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 171-178, 1999).

DURANTHON, V.; WATSON, A. J.; LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, v.135, n. 2, p. 141-150, 2008.

EDWARDS, L.J.; BATT, P.A.; GANDOLF, F.; GARDNER, D.K. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrate stimulate bovine embryo development. **Mol.Reprod. Dev.** v.47, p. 146-154, 1997.

EID, L.N.; LORTON, S.P.; PARRISH, J.J. paternal influence on S-phase in the first cycle of the bovine embryo. **Biol. Reprod.**, v.51, p.1232-1237, 1994.

EID, L. N.; PARRISH, J.J. Duration of the G2-phase and onset of M-phase during the first cell cycle of bovine embryo is dependent on bull *in vivo* fertility. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.205, 1995.

ELIAS, F.P. Avaliação do efeito do touro e da biópsia de um blastômero na sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2007.

ELIAS, F.P.; FERNANDES, M.B.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.; LÔBO, R.B. Avaliação da Fertilidade *in vitro* do sêmen bovino baseado na produção de embriões com 16 a 32 células. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (suplemento), p.328, 2003.

ELLIS, S.B.; HARPOLD, M. M. Nucleic acid probes for prenatal sexing. PCT WO 1986; 86/07095.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA [EMBRAPA]. Banco de Notícias, Brasília. Disponível em <http://www.embrapa.br/bancodenoticias>. Acesso em 14 de Novembro de 2006.

FERNANDES, M. B. Efeito do touro na sobrevivência de embriões *in vitro* ao congelamento. 83p.; 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FEUGAN, J.M.; CAMARGO-RODRIGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v.121, p.141-149. 2009.

GILBERT, S.F. Biologia do desenvolvimento. 5ª edição. Editora FUNPEC. 2003.

GOOSSENS, K.; SOOM, A. V.; POUCKE, M. V.; VANDAELE, L.; VANDESOMPELE, J.; ZEVEREN, A. V.; PEELMAN, L. J. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Developmental Biology**, 7:64, 2007.

GRANT V. J.; CHAMLEY, L. W. Sex-sorted sperm and fertility: an alternative view. **Biol Reprod**, v. 76, p. 184–188, 2007.

GRANT V. J.; IRWIN, R. J. Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos. **J Exp Zool A Comp Exp Biol**; v. 303, p.1120–1125, 2005.

GRANT, V.J.; IRWIN, R.J.; STANDLEY, N.T.; SHELLING, A. N.; CHAMLEY, L.W. Sex of bovine embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone. **Biol Reprod**, v. 78, p. 812–815, 2009.

GUNSKI, R. J., BEZERRA, L. A. F., MEIRELLES, F. V., LOBO, R. B. Efeito Do Dna Mitocondrial Sobre Características De Crescimento Pré-Desmama Na Raça Nelore In: XXXVIII Reunião Anual Da SBZ, 2001, Piracicaba. **Anais Da 38ª Reunião Anual Da SBZ**. Piracicaba. v.1. p.634–635, 2001.

GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ, G.; GRANADOS, J.; GARDE, J.J.; PEREZ-GUZMAN, M.; PINTADO, B. de la F. J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Zygote**, v. 7, p. 37–43, 1999.

GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p. 1117-1126. 2001.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed., Ed. Monela, 2004.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MC CAULEY, A.D.; MOYER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.141-152, 1995.

HOLM, P.; SHUKRI, N.N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental Kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. **Theriogenology**, v.50, p. 1285-1299, 1998.

HOLM, P.; SHUKRI, N.N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. **Theriogenology**, v 50, p. 1285 – 1299, 1998.

HOSSEPIAN de LIMA, V. F. Como e quando a sexagem de espermatozóides faz a diferença. **O Embrião**, n 26, 2006.

HOSSEPIAN-DE-LIMA, V.F.M.; RAMALHO, M.D.T.; RODRIGUES, L.H.; MALHEIROS, E.B.; MOREIRA FILHO, C.A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, p. 480 (abstract), 2000.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozóides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **R. Bras. Zootec.**, v.36, suplemento especial, p.219-228, 2007.

HYLAN, D.; GIRALDO, A.M.; CARTER, J.A. GENTRY, G.T.; BONDIOLI, K.R.; GODKE, R.A. sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. **Biol. Reprod.** 2009.

IWATA, H.; SHIONO, H.; KON, Y.; MATSUBARA, K.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effects of modification of *in vitro* fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 234-244, 2008.

KOCCHAR, H.P.S.; PEIPPO, J.; KING, W.A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v. 55, p 3-14, 2001.

KOCHHAR, H.S.; KOCCHAR, K.P.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution *in vitro* produced bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.** v.77, p.33-49. 2003.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.

LIU, H.; KIM, J. M.; AOKI, F. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. **Development**, v. 131, n. 10, p. 2269-2280, 2004.

LÔBO, R. B.; BEZERRA, L.A.F.; VOZZI, P.A; OLIVEIRA, H.N.; MAGNABOSCO, C. de U.;...; ALBUQUERQUE, L.G.; SAINZ, R.D; BERGMANN,J.A.G.;FARIA; OLIVEIRA, C. de U. **Avaliação Genética de Touro e Matrizes da Raça Nelore: Sumário 2011**. Ribeirão Preto, 124p. Ribeirão Preto, ANCP, 2006.

LÔBO, R.B.; REYES, A.; FERRAZ, J.B.S. Bivariate animal model analysis of growth weights and scrotal circumference of Nelore cattle in Brazil. **In: 5° World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Guelph. *Proceedings*. Guelph: s.d., p.199-202, 1994.

LONERGAN, P. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reprod. Dom. Animal**, v.29, p.12-21, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B. & DE LA FUENTE, J. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v. 69, 1424–31, 2003.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. **Theriogenology**, v.71, p. 1289-1297. 2009.

MADRID-BURY, N.; FERNANDEZ, R.; JIMENEZ, A.; PEREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.N. PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. effect of the ejaculate, Bull, and Double swim-up processing method on sperm sex ratio. *Zygote*, v. 11, p. 229-235, 2003.

MARQUANT-LE GUIENNE, B. HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 30, p. 259-266, 1990.

MARTIN, L.C.; BRINKS, J.S.; BOURDON, R.M. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.4006-4017, 1992.

MARTINEZ, F.; KAABI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. **Theriogenology**; v. 62, p.1264–1270, 2004.

NAVARA, C.S.; FIRST, N.L.; SCHATTEN, G. Phenotypic variations among paternal centrosomes expressed within the zygote as disparate microtubule lengths and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. **Developmental Biology**, v.93, p.5384-5388, 1996.

OSTERMEIER, G. C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J. D.; DIAMOND, M. P.; STEPHEN A.K. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, V. 429, p.154, 2004.

PALMA, G. A., MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** v.110(2), p.347-353. 1997.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44:859-869, 1995.

PEGORARO, L. M. C.; THUARD, J. M.; DELALLEAU, N.; GUERIN, B.; DECHAMPS, J.C.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Comparison of sex ratio and cell number of IVM – IVF bovine blastocysts co-culture with bovine oviduct epithelial cells or VERO cells. **Theriogenology**, v. 49, p. 1579-1590, 1998.

PEIPPO, J.; RATY, M.; KORHONEN, M.; ERONEN, M.; KANANEN, K.; HURME, T.; HALMEKYTO, M.; MAKI-TANILA, A. **Zygote**, p.1-10. 2009.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; COSTA, F.A.A.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética da idade ao primeiro parto e do perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, 2001.

PERIPATO, A.C. Relação entre o perímetro escrotal de Touros Nelore e a taxa de reação acrossomal induzida. Ribeirão Preto, 60p.; 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

POLLARD, J. W.; SCODRAS, J. M.; PLANT, L.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Definition of the cleavage stage (s) at which oviductal epithelial cells enable bovine embryo to pass through the *in vitro* 8-16 cell block. **Theriogenology**, v. 35, p. 256, 1991.

PONSUKISILI, S.; WIMMERS, K.; ADJAYE, J.; SCHELLANDER, K. A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.1611-1624, 2002.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod.Dev.** v. 26, p. 90–100, 1990.

TIFFIN, G. *et al.* Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **Journal Reproduction of Fertility**, v. 93, p. 125-132, 1991.

RHEINGANTZ, M.G,T; DESCHAMPS, J.C.; PIMENTEL, A.M.; PEGORARO, L.M.C. Influência dos métodos do gradiente de Percoll e do *swim-up* sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Rev Bras Reprod Anim**, v.26; p.312-316, 2002.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v.41, p.45-50, 1994.

SAS. SAS 9.1 Help and Documentation. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA, 1999.

SILVA, A. E. F.; DIAS, M. J.; DIAS, D. S. DE O.; DUARTE, J. B.; ANDRADE, J. R. A. Influência do momento da inseminação artificial sobre a fertilidade e o sexo da cria de novilhas da raça nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 997-1003, 2008.

SUZUKI K, GESHI M, YAMAUCHI N, NAGAI T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Anim Reprod Sci**, v.77, p.157-172, 2003.

UNCEIA Services Techniques Laboratoire de Fecondation *in vitro*. **Petit Atlas de l'Ovocite Bovin**. p.1-8,1998.

VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: 7º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, p.418-38, 1988.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility in vivo. **Mol Reprod Dev**. v. 60(1); p.47-55. 2001.

WATSON, A. J. The cell biology of blastocyst development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33: p. 492–504, 1992.

WATANABE, Y.F. A fecundação *in vitro* e reação acrossomal como critério de seleção para a fertilidade em touros da Raça Nelore. Ribeirão Preto, 79p.; 1998. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1998.

WRENZYCKI C; LUCAS-HAHN A.; HERRMANN D.; LEMME E.; KORSAWE K.; NIEMANN H. *In vitro* Production and Nuclear Transfer Affect Dosage Compensation of the X-Linked Gene Transcripts G6PD, PGK, and Xist in Preimplantation Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, 127–134, 2002.

WOLF, C.A.; BRASS, K.E.; RUBIN, M.I.B.; POZZOBON, S.E.; MOZZAQUATRO, F.D.; F.D.; CORTE, DE LA. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos **Anim. Reprod**, v.5, n.3/4, p.110-115 2008.

ZERBINI, F. L.S. Influência da adição de glicose 2.25mM em meio de cultivo na cinética de desenvolvimento embrionário. 38p, 2005. Monografia (Trabalho de conclusão) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

ZOHEIR, K.M.A; ALLAM, A.A. A rapid method for sexing the bovine embryo. **Anim. Reprod. Sci**. v.119, p. 92-96. 2010.

Anexo

ANEXO**1. Estoque TALP - Sêmen**

Componentes	(/100ml de H ₂ O mili Q)
NaCl	0,5820g
KCl	0,0230g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0080g
NaH ₂ PO ₄	0,0035g
NaHCO ₃	0,2100g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0300g
Lactato Na 60%	310ul
Vermelho Fenol	0,0010g
Hepes	0,2380g

2. Estoque Fecundação (FIV)

Componentes	(/100ml de H ₂ O milli Q)
NaCl	0,6660g
KCl	0,0240g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0100g
NaH ₂ PO ₄	0,0041g
NaHCO ₃	0,2100g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0300g
Lactato Na 60%	143ul
Vermelho Fenol	0,0010g

3. Estoque de meio de cultivo CR2:

Componentes	Concentração (mM)
NaCl	108.0
KCl	3.0
NaHCO ₃	25.0
Hemicálcio Lactato	0.5
Piruvato	0.4
BME	2ml
MEM	1ml
L-glutamina	1.0
Penicilina	100UI/ml
Estreptomicina	100µg/ml
Vermelho Fenol	5,6 x 10 ⁻⁴ mM

Anexo de Publicação

1. Exame de qualificação

Influence of the bull on the survival of embryos produced by *in vitro* fertilization technique following the removal of one blastomere^a

Fernanda Prado Elias¹; Reginaldo Aparecido Vila¹; Pedro Alejandro Vozzi²; Marli Aparecida Vanni Galerani¹; Raysildo Barbosa Lôbo¹.

¹Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

² National Institute of Agricultural Technology, Trelew, Patagonia, Argentine.

^aFinancial Support: Research Foundation of the State of São Paulo.

Corresponding author: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Bloco C, Avenida dos Bandeirantes, 3900, ZP: 14049-900 Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil.

Phone: +55 16 3602 4909 FAX: +55 16 3602 4910.

E-mail: fpelias@genbov.fmrp.usp.br

Summary

Reproductive biotechnology is currently emerging in the world scene as one of the most important tools for the development of cattle breeding, since it accelerates the process of genetic improvement of cattle. This work focus on the influence of both the bull and the biopsy of embryos in the stage of 8–16 cells on the survival of the embryos produced by biotechnology of fertilization *in vitro*. The oocytes were collected from cows butchered in slaughterhouses. Viable spermatozooids of 10 bulls were obtained by centrifugation in a Percoll gradient and were used for fertilization *in vitro*. After 12 hours, the presumptive zygotes were transferred to a culture medium and co-cultured with cumulus cells. For each bull two groups were selected, one for test and one for control, with three consecutive recurrences. On the third day of the culture, one blastomere was removed from the embryos in the test group, using micropipettes and a micromanipulator coupled to an inverted microscope. The culture proceeded for 168 hours after the *in vitro* fertilization; the viable embryos were counted in the following groups: hatched blastocyst, expanded blastocyst, blastocyst, and early blastocyst. The results showed that the total aspiration of one single blastomere in the stage of 8-16 cells does not commit the development *in vitro* of those embryos but it influences the production of hatched blastocyst and expanded blastocyst.

Key Words: biopsy, blastomere, embryo, fertilization *in vitro*, micromanipulation, nelore.

Introduction

Over the past decades, micromanipulation has been largely used in Cell Biology, Embryology, Clinical Sciences and Genetic Engineering. It involves the use of microscope and micro-tools to operate cell structures and several techniques have been used in animals, plants and humans (Yang; Anderson, 1992).

The increased use of the biopsy of embryos technique was due to the development and application of molecular technique to embryology, such as DNA probes (Gavio *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004;) and polymerase chain reaction - PCR (Machaty *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2001).

Ever since genotyping protocols from one single cell were determined, several bovine herd selection centers have become interested in the preimplantation genetic diagnosis for sex determination, or else, for molecular markers of genes of interest (Chrenek *et al.*, 2001).

The rupture of the pellucid zone by micromanipulation techniques causes significant modifications such as: increase hatching and implantation rates of bovine embryos produced *in vitro* fertilization (Tominaga; Hamada, 2004). In mice, the removal of one blastomere in the stage of 4 cells was found to affect embryonary development in the stage of hatching (Terada *et al.*; 2009). However, other studies have shown that the biopsy did not interfere with the gestation rates in humans (Cohen *et al.*; 2007) or in the global pattern of gene expression (Duncan *et al.*; 2009).

At times of genomic selection, the determination of viable protocols for the removal of a single cells and DNA amplification with the purpose of preimplantation diagnosis can be an interesting tool for bovine herd selection centers that already use genomic selection.

Therefore, it is necessary to determine whether the injury caused by the biopsy needle damages the bovine embryonary development *in vitro* and, particularly, developmental kinetics. Within this context, the present study tested the influence of the bull on the survival

of embryos produced by the biotechnology of fertilization *in vitro* following the removal of only one blastomere.

Material and Methods

Oocyte collection and *in vitro* maturation

The oocytes were collected from cows butchered in slaughterhouses and transported to the laboratory (until 2 hours after slaughter) in a thermal recipient containing sterile saline solution with penicillin (100UI/mL) and streptomycin (50mg/mL) at 35°C. As soon as they arrived in the laboratory, the oocytes were washed in a new sterile saline solution and stored in water bath at 35°C. The cumulus-oocyte (COC) complexes were separated from the 2-8 mm diameter antral follicles by means of manual aspiration with a 10 mL syringe coupled to the 18G needle. The COCs were selected by stereomicroscope according to the morphological characteristics and only those with complete and compact multilayers of cumulus and homogeneous ooplasm were selected. After the selection, the COCs were washed twice in a TCM-199 washing medium with Earle's salts, glutamine, NaHCO₃, HEPES (Gibco Laboratory, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% deactivated bovine fetal serum (SFB, Gibco Laboratory, Grand Island, NY, USA), sodium pyruvate (0.2 mM) and gentamicin sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Then, the COCs were washed twice in TCM-199 maturation medium with Earle's salts, glutamine, NaHCO₃, with addition of 10% of deactivated SFB, sodium pyruvate (22µg/mL), estradiol (1µg/mL), FSH (0.5 µg/mL) and LH (50µg/mL) and placed in drops of maturation medium on 35-mm plates covered with 4 mL mineral oil and taken to the incubator at 39°C, 5% of CO₂ in open air and maximum humidity, during 24h.

***In vitro* fertilization**

After 24 hours of *in vitro* maturation, the COCs were washed twice in fecundation medium (TALP supplemented with heparine-10µg/ml, pyruvate-22µg/ml, gentamicine-50mg/ml, BSA without fat acids-6mg/ml and PHE solution- 2µM of penicillamine, 1µM of hypotaurine and 0,25µM of epinephrine) and placed on drops of the fecundation plate after addition of the semen at the concentration of 2×10^6 spermatozoa/mL and then taken to the incubator at 39°C, 5% of CO₂ in open air and maximum humidity during 12h.

Cultivation of embryos

After the incubation period, the supposed zygotes were washed and subjected to pipetting in IVF medium to remove the excess of cumulus cells and sperm adhered, so that there only 3 layers of cumulus cells adhered to the pellucid zone, The zygotes were co-cultivated with monolayers of cumulus cells in microdrops of 50µl of microdrops of cultivation medium CR2aa (Rosenkrank; First, 1994) with addition of 10% of SFB and aminoacids, covered with mineral oil for 168 hours after the beginning of *in vitro* fecundation under incubation in atmosphere with 5% of CO₂ in open air at 39°C.

Biopsy

The embryos that were not in the development stage of 8 – 16 cells (unviable), 72 hours after the beginning of the *in vitro* fecundation of the test and control groups were discarded; the viable embryos of the test group were washed and transferred to microdrops with the micromanipulation medium, according to the protocol of Chrenek *et al.* (2000). With the aid of a maintenance micropipette with internal diameter of 100µm coupled to the micromanipulator of two posts (Narishige Co., Ltda., Tokyo, Japan) equipped with inverted microscope (Olympus Optical Co., Ltda., Tokyo, Japan) the embryo was fixed (Figure 1A). With the biopsy micropipette with internal diameter of 35µm and beveled model, the pellucid

zone was ruptured (Figure 1B) and one blastomere was removed (Figures 1C and 1D) by gentle suction. After the biopsy, the embryos were washed in cultivation medium and returned to the cultivation plate to continue their development. On the fourth day of cultivation, the unviable structures were removed, as well as the excess cumulus cells, and the microdrops were refreshed with the removal of 30 µl of medium and addition of 30 µl of new cultivation medium.

Classification of viable embryos

After 168 hours of IVF (seventh day of *in vitro* cultivation), the number of viable embryos was evaluated, and the embryos were classified according to their morphology in the blastocyst stage. We assessed the number of young, expanded and hatched blastocysts, as a method to evaluate the kinetics of preimplantation development.

Statistical Analysis

Statistical analysis was processed by the e Statistical Analysis Systems software (SAS, 2003). The percentage data were transformed by arcsine (Donnay; Leese, 1999 apud Dagnelie, 1986). Then, normality was tested by means of the Shapiro-Wilk test using the NORMAL command in the GLM procedure.

Complete Randomized Block Design (RBD) “two ways” model was used, where each bull was considered a block with two treatments: presence or absence of biopsy. Variance analysis (ANOVA) to verify the effect bull and the effect biopsy on the development of embryos on the seventh day of cultivation was also performed by the GLM procedure.

Results and Discussion

We have evaluated the number of young, expanded and hatched blastocysts as a method to assess the kinetics of preimplantation development. In total 3,204 oocytes were used for the Control and Biopsy groups of 10 bulls evaluated, which resulted in the development of 596 embryos in the control group and 523 in the biopsy group.

Besides, the biopsy did not interfere with the *in vitro* fertility of these animals, though it interfered in the development of hatched blastocyst ($p < 0.01$) and expanded blastocyst ($p < 0.01$).

Influence of bull in the development of intact and biopsied blastocysts

The *in vitro* fertility is expressed by the percentage of embryos that developed from the total oocytes used. The Skapiro-Wilk test has shown that the transformed data had normal distribution. Variance analysis has shown that there was a difference between the bulls ($p < 0.01$) concerning *in vitro* fertility in the development of embryos in the young blastocyst stage ($p < 0.05$) in the two treatments, without variation between the repetitions.

This difference is in a considerable degree explained by the bull effect, because the selected oocytes were from degree I and 2-8 mm follicles visible around the ovaries; according to Pavlock; Lucas-Hahn; Niemann (1992), oocytes of this origin have equal development potential, which minimizes the maternal effect. Moreover, the media used in the maturation of the oocytes, selection and training of semen, fecundation, micromanipulation and cultivation of embryos were standardized for all the experiments, and the bulls were evaluated in pairs and in three replicates followed by the experiment, further reducing the possible sources of variation.

The bulls used in this experiment belong to the Programmed Reproduction project of the Program for Genetic Improvement of the Nelore breed Brasil, where animals aged 18-36

months identified according to the High Genetic Merit (HGM) as genetically superior, by means of genetic evaluation, and capable of producing high quality sperm are selected (Lôbo *et al.*, 2010). Therefore, the results related to the *in vitro* fertility of these bulls confirm the existing information on the fertility of these animals, are not less important for the bovine herd selection centers that use these animals in the *in vitro* system of embryo production (IVP).

Due to the correlation between *in vitro* and *in vivo* fertility (Marquant-Le Guienne, 1992), the *in vitro* fertility trait of a bull can be a selection criterion at the time of choosing a breeder to be used in the IVP, or even, a way to assess the fertility of a bull faster than it is obtained with *in vivo* methods, or to preevaluate the fertility of young males that will be part of programs of transfer of embryos or *in vitro* production in the beginning of their reproductive lifecycle.

The fact that the bulls differ concerning the production of young blastocyst can be a criterion of selection of the bull to be used in the IVP since some studies have shown that bulls with better kinetic parameters produce better embryos (Eid; Parrish, 1995; Comizzoli *et al.*, 2000). The difference concerning the production of young blastocyst can be explained by the bull effect, a characteristic independent of this fecundation potential, which interferes in the post-compacting period because on the third day of cultivation the embryos that were not in the stage of 8-16 cells were discarded, that is, on this day the embryos that remained on the cultivation plate had a very similar developmental kinetics.

Finally, the evaluation of the stages of development of the embryos produced associated to the knowledge of *in vitro* fertility is of paramount importance to the selection of bulls to be used in *in vitro* production systems, since the success of the pregnancy depends, among other factors, on the quality and stage of development of the embryo at the time of the transfer to the receptor cow (Hasler, 1995). More than that, these data pave the way to research on bull kinetics and molecular biology.

Thanks to the advancements in molecular studies concerning the stage-specific pattern of genetic expression during the development of the preimplantation of bovine embryos (Ponsukisili *et al.*, 2002), it is possible to obtain the answer or the correlation with the expression of some gene related to the development of this variation, in relation to the stage of development of its embryos.

The possibility of selecting the sex of the embryo offers practical and economic advantages to the animal production industry (Almeida; Alvarez, 2003). In their study, Bredbacka *et al.* (1994) demonstrate that biopsied embryos have sufficient cellular mass for the cellular signaling necessary to maintain a successful pregnancy. Besides, Park *et al.* (2001) have managed to establish a fast sexing method by means of PCR from only one blastomere removed from the embryo in the stage of 8-16 cells, such as the biopsy performed in the present study.

In this context, and considering the analysis of the results obtained with the biopsied groups, the fact that the bulls differed among themselves concerning the survival of their embryos after biopsy just like the control group can be a criterion of selection of these animals when it comes to choose the sexing biotechnology, that is, to reserve for those bulls with low survival rate of embryos cultivated *in vitro* the sexed semen, and the use of biopsy and PCR analysis to those animals with higher rates of *in vitro* embryonary development.

In order to be commercially viable, the sexing technique must be reproducible, inexpensive and fast enough to allow the evaluation of a large number of embryos in a short period of time (Tominaga; Hamada, 2004). The results obtained demonstrate that the embryo biopsy in the stage of 8-16 cells does not compromise its later development, so that this procedure can be used for preimplantational diagnosis of sexing, in view of the existence of advanced techniques of sexing from only one blastomere.

The main advantage of sexing on the 3rd day of cultivation is the possibility of performing this procedure in a greater number of embryos than it is possible on the 6th day of cultivation, when the method used is the extraction of a small amount of cells of the internal part of the embryo, where the cavitation process has already begun, and, in some cases, the biopsy of one blastomere in the stage of 8-16 cells would eliminate the need for embryo cryopreservation (Park *et al.*, 2001).

Effect of the biopsy on the development of blastocysts

In the present study, the percentage of development of the total number of embryos in the control and biopsy groups in relation to the number of oocytes used were similar without statistical difference between them ($p>0.05$).

Similarly, Cieslack-Jansen *et al* (2006) in a retrospective analysis did not find difference in the development rates in intact human embryos and embryos subjected to micromanipulation for preimplantation diagnosis. This confirms that the biopsy of bovine embryos prior to the formation of the gap junctions between the blastomeres, that is, until the stage of 8-16 cells does not reduce the potential of development of the biopsied embryos. Besides, the removal of only one blastomere in this stage does not interfere with the number of cells in the blastocyst. If the biopsy were performed after the formation of these gap junctions, the procedure would lead to disruption of the cell-cell contacts, and would result in a lower index of embryo development (Park *et al.*, 2001).

Also, it is important to mention that embryonic transcription does not occur, or is very low in the stage of 8-16 cells, with embryonary development being sustained by maternal stocks transcribed during the process of oocyte growth and maturation. Therefore, the trauma generated by microaspiration of one blastomere is minimal and does not affect the

embryonary development potential, which was similar to the percentages found by other authors (Chrenek *et al*, 2001).

The correlation between the *in vitro* fertility of the bull and its post-biopsy embryonary survival shows that the more fertile the bull, the greater the survival of its embryos after removal of one blastomere. Thus, the characteristic *in vitro* fertility can provide valuable information not only regarding the fertility of an animal, but also its performance in the production of *in vitro* embryos to be biopsied by any reason, either for marker selection or sexing.

The analysis of the survival of intact embryos (Table 1) and biopsied embryos (Table 2) has shown that the biopsy interfered with the development indexes of embryos in stages hatched blastocyst and expanded blastocyst.

These results are consistent with the findings obtained by other authors (Bredbacka *et al.*, 1994 Park *et al.*, 2000; Chrenek *et al.*, 2001) who also found similar development rates for embryos on the seventh day of cultivation, and demonstrates that the pipette for micromanipulation penetrates the pellucid zone for aspiration of the blastomere, facilitating the hatching of blastocysts after the expansion. On the other hand, Almodin *et al* (1999), Lopes (2001) and Polissene *et al* (2008) did not find any differences in the development of hatched blastocysts between the biopsy and control groups.

As for hatching, we found that it occurred always at the site of removal of the blastomere, and, thus, the embryo exhibited constriction in the point of hatch of the pellucid zone. The control embryos, in turn, have ruptured the pellucid zone and hatched within the fissure formed, which did not allow constriction in the point of the hatch. These differences were also observed by Terada *et al* (2009) in their experiments with mice.

However, the considerable embryonic development in the stage of hatched blastocyst may put at risk the results of the pregnancies. In 2002, Dayan *et al.* found that embryos transferred in

the stage of expanded blastocyst had better pregnancy results, whereas the embryos transferred in the stages of hatched blastocyst, blastocyst and young blastocyst had less significant results.

Finally, it has also been demonstrated that it is possible to remove one blastomere of the embryo in the stage of 8-16 cells without damaging its later development. It has also been shown that the assessment of *in vitro* fertility of a bull alone may provide information on its performance on the development of biopsied embryos.

Techniques such as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR), at a time where human reproduction techniques prevail, can be used in preimplantation diagnosis. In order to have access to preimplantation diagnosis, a sample of the studied gametes or embryos is required, which can be done by means of a biopsy. Nevertheless, in order to have a good application of this diagnosis, proper technique and training are required (Almondin *et al.*, 1999).

The biopsy of blastomeres has been done by different techniques: with the opening of the pellucid zone using acydic Tyrode's solution and micropipette for the aspiration of the blastomeres; partial dissection of the zone where a micropipette is passed through an area of the pellucid zone, and with the aid of a micropipette of aspiration for support an opening is made where the micropipette of aspiration reaches the blastomere; or else the pellucid zone is crossed using a beveled micropipette that removes the blastomere (Almeida; Alvarez, 2003), as it has been done in this work. Also, it is possible to remove the blastomere by means of a displacement technique, where two holes are made, with a gentle flow through one of the holes and the blastomere being extruded through the other hole (Vajta *et al.*, 1997).

All the methods used in the biopsy need training, because they may involve some problems such as loss of blastomeres and embryos, as well as inaccurate interpretation of test results. There are many controversies among the authors as to the best technique for blastomere

biopsy. The technique to be selected must maintain the removed blastomere intact to avoid the loss of genetic material and cause the least possible damage to the embryo, to ensure its viability.

The use of acidic Tyrode's solution to make the hole where the aspiration pipette will be inserted can cause damage to the embryos due to the pH acidity, if the person responsible for the manipulation is not sufficiently skilled and fast (Almondin *et al.*, 1999). Therefore, the method used in this study has proven to be efficient, and can be used not only for bovine reproduction, but also as training for biopsy in human embryos, since it is easy to collect oocytes from cows butchered in slaughterhouses and obtain commercialized semen, making it possible the *in vitro* maturation of gametes and the follow-up of the phenomenon of fertilization and embryonary development.

The access to a large number of gametes and embryos in a short time period makes it possible to perform the training in a short period of time, and it is believed that an expert who skillfully manipulates the bovine embryos is also able to manipulate human embryos. Also, this expert will count on a model that improves the new techniques that are constantly developed, such as the recent technique of laser used to open the pellucid zone and the transplant of cytoplasm and nucleus (Almondin *et al.*, 1999). In order to attest to the efficiency of this proposal, the biopsied embryos were always compared to a control group subjected to the same conditions of culture and manipulation.

Finally, it has been demonstrated that the removal of only one blastomere of an embryo in the stage of 8-16 cells does not affect its development until the blastocyst stage, being the *in vitro* fertility of a bull proportional to the survival of the biopsied embryos. Besides the use of this protocol in high genetic value bovine herd selection centers, it can also be developed by other assisted reproduction centers for the technical training of micromanipulation, due to the similarities found in the preimplantation development of bovine and human embryos.

Conclusions

It has been demonstrated that the removal of only one blastomere of an embryo in the stage of 8-16 cells does not affect its development until the blastocyst stage, with the *in vitro* fertility of a bull being proportional to the survival of the biopsied embryos.

Aknownledgement

To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the doctoral scholarship received.

To the National Association of Breeders and Researchers and to the Program for Genetic Improvement of the Nelore breed Brasil, for the donation of the semen used.

References

- Almeida, G. P., Alvarez, R. H. 2003. Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. B. Industr. Animal. 6:185-196.
- Almodin, C. G.; Moron, A. F.; Kulay J, L. 1999. Avaliação do desenvolvimento de embriões bovinos pós-biópsia: um modelo para treinamento. RBGO. 21:533-538.
- Bredbacka, P.; Velmala, R.; Peippo, J.; Bredbacka, K. 1994. Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryo. Theriogenology. 41:1023-1031.
- Chrenek, P.; Boulanger, L.; Heyman, Y.; Uhrin, P.; Laurincik, J.; Bulla, J.; Renard, J. P. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from single cell of bovine embryo. Theriogenology. 55:1071-1081.
- Cieslak-Janzen, J.; Tur-Kaspa, I.; Ilkevitch, Y.; Bernal, A.; Morris, R.; Verlinsky, Y. 2006. Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. Fertility and Sterility. 85(6):1826-1829.
- Cohen, J.; Well, D.; Munné, S. 2007. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. Fertility and Sterility. 87: 496-503.
- Dayan, A.; Watanabe, M.R.; Ferraz, M.L.; Meirelles, F.V.; Watanabe, Y. F. 2002. Influence of the Embryo Stage, Development Kinetics and Recipient Synchronization on Pregnancy Rates of OPU-IFV Embryos. Theriogenology. 57:492.

- Donnay, I.; Leese, H.J. 1999. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 53:171-178.
- Duncan, F.E.; Stein, P.; Williams, C.J.; Schultz, R.M. 2009. The effect of blastomere biopsy on pre implantation mouse embryo development and global gene expression. *Fertility and Sterility*. 91:1462-1465.
- Eid, L. N.; Parrish, J.J. 1995. Duration of the G2-phase and onset of M-phase during the first cell cycle of bovine embryo is dependent on bull *in vivo* fertility. *Theriogenology*. 43:205.
- Gavio, D., Fernandes, M. B., Villa, R. A., Galerani, M. A., Martelli, L. R., Lobo, R. B. 2001. Aplicação do método de Fish para determinação do sexo em embriões zebuínos produzido *in vitro*. 2001. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 25:404 – 407.
- Hasler, J.F.; Henderson, W.B.; Hurtgen, P.J.; Jin, Z.Q.; MC Cauley, A.D.; Moyer, S.A.; Neely, B.; Shuey, L.S.; Stokes, J.E.; Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43:141-152.
- Lee, J H; Park, JH; Lee, SH; Park, CS; Jin, DI. 2004. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Theriogenology*. 62:1452–1458.
- Lôbo, R. B.; Bezerra, L. A. F.; Vozzi, P. A.; Magnabosco, C de U.; Albuquerque, L. G.; Sainz, R. D.; Bergmann, J. A. G.; Faria, C. de U.; Oliveira, H.N. 2010. Avaliação genética de touros das raças nelore, guzerá, brahman e tabapuã: sumário 2010:146.
- Lopes, R.F., Forell, F., Oliveira, A.T. *et al.* 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*. 56:1383-1392.
- Machaty, Z.; Paldi, A.; Csaki, T.; Varga, Z.; Kiss, I.; Barandi, Z. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. 1993. *J Reprod Fertil*. 98:467–70.
- Marquant-Le Guienne, B. Humblot, P.; Thibier, M.; Thibault, C. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:259-266.
- Tominaga, K.; Hamada, Y. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. *Theriogenology*. 61:1181-1191.
- Park, J.H.; Lee, J.H.; Choi, K.M.; Joung, S.Y.; Kim, J.Y.; Chung, G.M.; Jin, D.I.; Im, K.S. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology*. 55:1843-1853.
- Pavlock, A.A.; Lucas-Hahn, J.; Niemann, H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol.Reprod.Dev.* 31:63-67.
- Ponsukisili, S.; Wimmers, K.; Adjaye, J.; Schellander, K. 2002. A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*. 57:1611-1624.

Polisseni, J.; Ferreira de Sá, W.; Guerra, M.O.; Machado, M.A.; Serapi, R.V.; Carvalho, B.C.; Camargo, L.S.A.; Peters, V.M. 2010. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility*. 93:783-788.

Rosenkranks, C.F.; First, N.L. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J Anim Sci*. 72:434-437.

SAS. SAS 9.1 Help and Documentation. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA, 1999.

Terada, Y.; Ugajin, T.; Hasegawa, H.; Nabeshima, H.; Yaegashi, N. 2009. Different embryonic development after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis, observed by time-lapse imaging. *Fertility and Sterility*. 92:1470-1471.

Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. 1997. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*. 47:501-509.

Yang, X.; Anderson, G.B. 1992. Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities. *Theriogenology*. 38:315-335