



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA MICROMANIPULAÇÃO PARA
IDENTIFICAÇÃO DO SEXO SOBRE A VIABILIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN
VITRO*.**

REGIVALDO VIEIRA DE SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO/2007**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DA MICROMANIPULAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DO SEXO SOBRE A
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

REGIVALDO VIEIRA DE SOUSA

ORIENTADOR: Dr. RODOLFO RUMPF

CO-ORIENTADOR: Dr. MAURÍCIO MACHAIM FRANCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 268 / 2007

BRASÍLIA / DF
JUNHO / 2007

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA MICROMANIPULAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DO SEXO SOBRE A
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

REGIVALDO VIEIRA DE SOUSA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE
PRODUÇÃO ANIMAL.**

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Ph.D. (EMBRAPA / CENARGEN)
(Co-ORIENTADOR) CPF: 517.692.476-53
E-MAIL: mfranco@cenargen.embrapa.br**

APROVADA POR:

**RODOLFO RUMPF, Ph.D. (EMBRAPA / CENARGEN)
(ORIENTADOR) CPF: 295.718.049-91
E-MAIL: rodolfo@cenargen.embrapa.br**

**JAIRO PEREIRA NEVES, Ph.D. (FAV / UNB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 065.863.509-30
E-MAIL: jpneves@unb.br**

**MARGOT ALVES NUNES DODE, Ph.D. (EMBRAPA / CENARGEN)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 395.928.980-49
E-MAIL: margot@cenargen.embrapa.br**

BRASÍLIA/ DF, 26 de junho de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Regivaldo Vieira de

Efeito da micromanipulação para identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. /

Regivaldo Vieira de Sousa; orientação de Rodolfo Rumpf – Brasília, 2007. 47 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. Bovino. 2. Embrião. 3. Identificação do sexo. 4. PCR. 5. Viabilidade Embrionária. I. Rumpf, R. II. PhD.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SOUSA, R. V. **Efeito da micromanipulação para identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 47 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Regivaldo Vieira de Sousa

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Efeito da micromanipulação para identificação do sexo sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

GRAU: Mestre

ANO: 2007

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Regivaldo Vieira de Sousa

CPF: 249.166.501-82

Quadra 10, conjunto "B", casa 18,

CEP: 73005-100, Sobradinho/DF-Brasil

Telefone: 61-84138776/ 61-39645945/ 61-3448-4697

E-mail: regiv@cenargen.embrapa.br

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus queridos pais Jaime de Sousa e Clarisse Vieira de Sousa, pela dedicação, companheirismo e carinho. Aos meus irmãos, pelo companheirismo, atenção e compreensão nos momentos difíceis. Aos meus orientadores Dr.Rodolfo Rumpf e Dr. Maurício Machaim Franco pelo incentivo e colaboração

Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro que possibilitaram a execução do trabalho.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf pela amizade e orientação em meu trabalho e seus conselhos que contribuíram na minha carreira profissional.

A Dra Margot, pelo incentivo, pela amizade, e ensinamentos durante estes vários anos de convivência na Embrapa.

Ao Dr. Guilbeth e a Dra. Célia, proprietários da Guilberth Veterinária Ltda, que permitiram e apoiaram todos os experimentos *in vivo*. Pela amizade, companheirismo e estímulo ao longo destes anos.

A Gênese Biotecnologia Ltda. e Agropecuária Palma, pelo pronto apoio no experimento com embriões produzidos *in vitro*. Empresas sempre incentivando a pesquisa agropecuária

Ao Dr. Maurício Machaim Franco, pela amizade, ensinamentos, Aos colegas Emivaldo e Juliana pelo desprendimento, boa vontade e auxílio na execução dos experimentos com embriões produzidos *in vitro*.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos Eduardo Melo, José Urias, Marcelo Tigre, Ligiane, Rosangela, Marcio, que de uma forma ou de outra contribuíram para a concretização deste trabalho!

Por fim às pessoas que mais amo, minha família, minhas irmãs Marlene, Leila, Leide e Anaclady, meus irmãos Reginaldo e Jaime Filho, todos meus sobrinhos e sobrinhas, meus cunhados José Carlos, Hidelbrando Borba, Junior Américo, minha cunhada Silvana e aos meus pais Jaime e Clarisse por serem meus exemplos de honestidade, trabalho, amor, confiança e cumplicidade. A vocês agradeço por tudo que sou.

A Universidade de Brasília e a todos os professores e funcionários.

Aos colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disposição em ajudar sempre que necessário.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Micromanipulação de embriões	2
2.2. Identificação do sexo de embriões	4
3. OBJETIVO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Produção <i>in vivo</i> de embriões (TE)	12
4.1.1. Doadoras de embriões	12
4.1.2. Superovulação (SOV)	12
4.1.3. Colheita e busca dos embriões	13
4.1.4. Seleção dos embriões	14
4.2. Produção <i>in vitro</i> dos embriões (PIV)	14
4.2.1. Obtenção dos ovócitos imaturos – Aspiração dos folículos	14
4.2.2. Maturação dos ovócitos <i>in vitro</i> (MIV)	15
4.2.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	16
4.2.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	17
4.2.5. Seleção dos embriões para biopsia	17
4.3. Micromanipulação para obtenção da biopsia embrionária	18
4.4. Identificação do sexo dos embriões	20
4.4.1. Lise celular	21
4.4.2. Amplificação do DNA	22
4.4.3. Eletroforese	23
4.4.4. Interpretação dos resultados	23
4.5. Inovulação dos embriões	24
4.6. Diagnóstico de gestação e identificação do sexo fetal	25
4.7. Delineamento experimental	25
4.7.1. Experimento 1- Efeito da Biopsia em embriões produzidos <i>in vivo</i> sobre a taxa de prenhez	25
4.7.2. Experimento 2 - Efeito da biopsia em embriões produzidos e cultivados <i>in vitro</i> sobre a taxa de prenhez	26
4.7.3. Experimento 3 – Eficiência e acurácia da técnica de identificação do sexo por PCR em embriões produzidos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	27
4.8. Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema de micromanipulação montado em estereomicroscópio. -----18
- Figura 2.** Microlâmina e haste metálica articulada, destinadas a bipartição e microsecção de embriões. -----19
- Figura 3.** Seqüência de procedimento de biópsia: Posicionamento e microsecção do embrião. -----19
- Figura 4.** Gel de agarose mostrando os controles: A) Marcador; B) Controle negativo, sem DNA; C) Controle positivo com DNA de macho; D) Controle positivo com DNA de fêmea. -----24
- Figura 5.** Gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de biópsias embrionárias: L) marcador de peso molecular; C_N, C_M e C_{Au}) controles; M) amostras de embriões machos e F) amostras de embriões fêmeas. -----36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez e perda embrionária/fetal de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> . -----	29
Tabela 2. Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez aos 30 dias em embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> em diferentes estágios de desenvolvimento. -----	30
Tabela 3. Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> . -----	32
Tabela 4. Efeito da fase de desenvolvimento do blastocisto biopsiado sobre a taxa de prenhez aos 60 dias. -----	34
Tabela 5. Eficiência da sexagem de acordo com o experimento. -----	35
Tabela 6. Acurácia da técnica de PCR para identificação do sexo comparada a sexagem por ultra-som. -----	37

EFEITO DA MICROMANIPULAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DO SEXO SOBRE A VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

RESUMO

Com o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida, a produção de embriões *in vivo* (TE) e *in vitro* (PIV), tem crescido consideravelmente e por conseqüência, a demanda por metodologia eficaz de identificação do sexo desses embriões. Este trabalho teve por objetivo avaliar um sistema de identificação do sexo (Diagnóstico pré-implantacional do sexo) de embriões bovinos produzidos em programas comerciais de TE e PIV. Os embriões produzidos *in vivo* (n=609) foram coletados de animais das raças Holandesa e Jersey, sete dias (D7) após a Inseminação Artificial (IA) nos estágios de mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx). Os embriões foram divididos em dois grupos: Grupo TE-B, constituído por embriões biopsiados e Grupo TE-C, constituído por embriões intactos (controle). Para o experimento de produção *in vitro*, foram utilizados embriões de bovinos da raça Gir (n=318), nos estágios de blastocisto inicial Bi, Bl e Bx, em D-6,5. Os embriões foram divididos em dois grupos: Grupo PIV-B, constituído por embriões biopsiados e Grupo PIV-C, constituído por embriões intactos (controle). Os embriões dos Grupos TE-B (n=380) e PIV-B (n=91) foram submetidos à micromanipulação por microsecção para retirada da biopsia. Os embriões biopsiados foram cultivados até o final do processo de identificação do sexo e então transferidos para receptoras síncronas. Os embriões do Grupo TE-C (n=229) e PIV-C (n=227) foram transferidos íntegros para receptoras síncronas no mesmo momento dos biopsiados. As receptoras foram submetidas à ultra-sonografia aos 30 (TE) e 60 (TE e PIV) dias após as inovulações para diagnóstico de gestação e confirmação do sexo, respectivamente. Para a identificação do sexo dos embriões biopsiados, as respectivas biopsias foram submetidas às técnicas de PCR e eletroforese em gel de agarose. Na reação, foram utilizados 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), sendo um específico para o cromossomo Y e o outro para um gene autossômico (controle da reação que amplifica uma seqüência de DNA específica em ambos os sexos). Para a comparação das taxas de gestação aos 60 dias, entre os grupos e respectivos controles, foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2) e não houve diferenças entre os grupos, com TE-B = 206/380 (54,21%), TE-C = 128/229 (55,89%); PIV-B = 24/91 (26,37%) e PIV-C=45/227 (19,82%). Das gestações confirmadas que tiveram suas respectivas biopsias submetidas à sexagem, 133 do Grupo TE-B, e 20 do Grupo PIV-B, foram avaliadas por ultra-sonografia aos 60 dias após as inovulações sendo que 124 (93,23%) e 19 (95%), respectivamente, tiveram sexo coincidente com aquele atestado pela PCR. O resultado deste trabalho indicou que o procedimento de retirada de biopsia de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* não interfere na viabilidade dos mesmos, e que a metodologia utilizada é viável para identificação do sexo dos embriões em programas comerciais de transferência de embriões.

Palavras chave: Bovino, Embrião, Biopsia, Viabilidade embrionária, PCR, Identificação do sexo.

EFFECT OF MICROMANIPULATION TO IDENTIFY SEX ON THE VIABILITY OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VIVO* AND *IN VITRO*.

ABSTRACT

With the advance of the assisted reproductive techniques, the use of *in vivo* (ET) and *in vitro* embryo production (IVP) has increased considerable, which has lead to a demand for an efficient method for embryo sexing. The present study aimed to evaluate the effect of the micromanipulation of ET and IVP embryos on their viability and to test, in field conditions, a methodology embryo sexing. *In vivo* produced embryos (n=609) were collected from Holstein and Jersey females. Embryo at compact morula (Mc), initial blastocyst (Bi), blastocyst (Bl) and expanded blastocyst (Bx) stage on Day 7 post insemination (D-7) were allocated into two groups: Group ET-B, biopsied embryos and Group ET-C, intact embryos (control). For the *in vitro* production experiment embryos of Gir breed females were used (n=318) at the initial blastocyst (Bi), blastocyst (Bl) and expanded blastocyst (Bx) stage at Day 6,5 post insemination. Embryos were distributed into two groups: Group IVP-B, biopsied embryos and Group IVP-C, intact embryos (control). Embryos from both groups ET-B (n=380) and IVP-B (n=91) were submitted to micromanipulation by section, for biopsy removal. Biopsied embryos were cultured until the end of the process of sex identification and then were transferred for synchronized recipients. Embryos from the groups ET-C (n=229) and IVP-C (n=227) were transferred intact to the synchronized recipients. All the recipients were evaluated by ultrasonography 30 (ET) and 60 (ET, IVP) days after in ovulation, for pregnancy and sex identification. For embryo sex identification the biopsies were submitted to PCR and agarose gel electrophoresis. In the PCR reaction 2 primers were used, one specific for Y chromosome and the other for a bovine autossomic gene. To compare pregnancy rates at 60 days between the groups and their respective controls a Chi-square(χ^2) analysis was used. No differences were observed for pregnancy rates between groups, being ET-B = 206/380 (54.21%), ET-C = 128/229 (55.89%); IVP-B = 24/91 (26.37%) and IVP-C = 45/227 (19.82%). Of the confirmed pregnancies that had their biopsies (ET-B = 133 and IVP-B = 20) submitted to sex identification, 124 (93.23%) and 19 (95%) had the same sex in the PCR reaction and in the ultrasonography evaluation at 60 days. The results of the present study indicated that biopsy removal did not affect the viability of the *in vivo* and *in vitro* embryos. In addition, the methodology used for embryo sex identification is suitable to be used in embryo transfer commercial programs.

Key words: Bovine, Embryo, Biopsy, *in vitro* Culture, Embryo viability, PCR, Sex identification.

1. INTRODUÇÃO

O grande avanço obtido na biotecnologia da reprodução animal tem permitido um aumento na eficiência reprodutiva e no ganho genético em rebanhos bovinos. A disseminação das biotécnicas de reprodução animal no setor produtivo está diretamente atrelada a adequação das mesmas para uso em programas comerciais. A determinação precoce do sexo em espécies de interesse econômico é um exemplo da necessidade dessas adequações.

A identificação precoce do sexo em bovinos é de grande interesse e tem um valor econômico significativo na pecuária tanto de leite, como de corte, naqueles sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos. O exemplo clássico é o direcionamento para a produção de fêmeas em rebanhos leiteiros. A introdução desta biotecnologia nestes programas pode aumentar a intensidade de seleção em até 25%, podendo-se elevar o número de vacas no próprio núcleo, permitindo uma melhor seleção de doadoras (Reichenbach, et al., 2001). Os benefícios da identificação prévia do sexo na aceleração do progresso genético, quando associada às técnicas de Inseminação Artificial (IA) e/ou Transferência de Embriões (TE), são relatados por diversos autores (Dell'aqua Jr., et al., 2006; Smith, 2002; Taylor, et al., 1985).

Diante da alta produção de embriões tanto *in vivo* pela TE, como pelos sistemas de produção *in vitro* (PIV), aliada à baixa eficiência das técnicas comerciais de sexagem de sêmen, vem-se observando uma crescente demanda pela identificação pré-implantacional do sexo destes embriões.

Além disso, tem sido observado principalmente nos sistemas *in vitro*, um desvio na proporção macho/fêmea, com a porcentagem de embriões do sexo masculino superior à proporção teoricamente esperada de 50% para cada um dos sexos (Pukazhenthil e Wildt, 2004).

Esses fatos abrem perspectivas para o desenvolvimento de sistemas efetivos de determinação do sexo dos embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, que cumpram com os requisitos de acuidade e manutenção da viabilidade dos mesmos. O presente estudo serve também como modelo para a análise de outros “marcadores” na seleção genética assistida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Micromanipulação de embriões

A micromanipulação de embriões se refere a qualquer procedimento que envolva manipulação celular embrionária. É um procedimento que, com o auxílio de um micromanipulador, permite que embriões em estágio inicial de desenvolvimento possam ser divididos em parte iguais para obtenção de gêmeos monozigóticos (bipartição ou bissecção) e/ou terem algumas células removidas para identificação do sexo e para diagnóstico genético pré-implantação (microsecção).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, existe um período em que os embriões de mamíferos podem ser micromanipulados sem reduzir, de maneira significativa, a capacidade de desenvolvimento posterior. A micromanipulação pode ser conduzida em embriões de duas células a embriões em estágio de blastocistos

(Willadsen; Polge, 1981). De acordo com os trabalhos de Ozil (1982); Ozil et al.(1982); Ozil (1983) e Williams et al.(1983), ficou evidente que apenas 30 a 40% da massa celular total é suficiente para refazer um indivíduo normal. Portanto, é possível por bissecção, dividir embriões em duas ou mais partes, transferi-las para receptoras e obter em média 25% de gêmeos, além de, elevar o número de gestações por colheita (Reichenbach, et al., 2001).

Da mesma forma, a microssecção, em que algumas células do embrião são removidas, permite que o embrião continue o seu desenvolvimento normal após ser transferido para uma receptora.

Vários estudos objetivando a retirada de parte das células de embriões bovinos (Carbonneau, et al., 1997; Keefer, et al., 1994; Kuznetsov, 1991; Lewis, 1994; Lopes, et al., 2001; Nibart, et al., 1988; Park, et al., 2001; Reichenbach, et al., 1998; Seidel, 1982), embriões ovinos (Herr, et al., 1990), ovinos e caprinos (Rao e Totey, 1992) e humanos (Handyside, et al., 1989) foram descritos.

Os métodos mais estudados para remoção de células embrionárias são a microaspiração e a microssecção. Os resultados encontrados na literatura são contraditórios quanto ao melhor método a ser utilizado. Thibier e Nibart (1995), comparando os métodos demonstraram que a microaspiração foi mais eficiente que a microssecção produzindo, 55% x 28% de prenhez, respectivamente. Já Carbonneau, et al., (1997) relataram, por outro lado, exatamente o contrario, onde a microssecção resultou em 66,2% de prenhez comparado com 47,7% para os embriões microaspirados. Devido às facilidades de utilização a nível de campo, o

método de microsecção é mais usado atualmente, visto que o método de aspiração requer um aparelho mais sofisticado, que dificilmente estará disponível em fazendas.

Esses mesmos autores relatam que a qualidade e a idade dos embriões têm significativa influência na sobrevivência e mostraram que embriões jovens em D5 não apresentam resistência ao estresse como os embriões em D7. Essa influência também foi comprovada por Reichenbach, et al. (1998), quando avaliaram a bipartição em mórulas jovens e tardias e de qualidade morfológicamente distinta.

Lopes, et al. (2001), comparando a taxa de prenhez de embriões produzidos *in vivo* biopsiados e intactos, obtiveram resultados similares.

Garcia et al. (1997), congelaram em etileno-glicol embriões bovinos nos estágios de Mc e Bl, produzidos *in vivo* e biopsiados por microaspiração, obtiveram taxa de prenhez que não diferiu dos embriões intactos (45,8% x 49,3%). Resultados semelhantes foram obtidos por Darrow, 2002, que avaliou o congelamento de embriões biopsados com glicerol e obteve taxa de prenhez pós-descongelamento de 50 a 56%.

A taxa de prenhez de 44,4%, com embriões produzidos *in vivo*, biopsiados por microaspiração e congelados em glicerol não diferiu da taxa obtida com embriões apenas congelados que foi de 49,5% (Roschlau, et al., 1997).

2.2. Identificação do sexo de embriões

Para a identificação do sexo de embriões, várias técnicas têm sido descritas. Neste caso, o método ideal de identificação do sexo em embriões deve cumprir os

requisitos de acuidade e manutenção da viabilidade dos mesmos. Van Vliet et al. (1989), analisaram os métodos de identificação do sexo de embriões e classificaram como “não invasivos”, quando mantém a integridade do embrião, e “invasivos”, quando envolvem a retirada de uma biopsia do mesmo.

Os métodos não invasivos são aqueles relacionados à atividade de enzimas ligadas ao cromossomo X e aqueles que permitem a detecção do antígeno H-Y (Gardon, et al., 2004; Williams, et al., 1983).

Nos mamíferos, o sexo feminino carrega dois cromossomos X. Sabe-se que no desenvolvimento embrionário precoce um desses cromossomos é inativado (Monk e Harper, 1978). No entanto, alguns estudos sugerem que antes da inativação haveria transcrição de ambos os cromossomos X, o que resultaria numa maior concentração e atividade de enzimas ligadas ao cromossomo X nos embriões fêmeas (Monk e Handyside, 1988; Kratzer, 1983). Baseado nisso, este método consiste em determinar o sexo de embriões por meio da análise da atividade de tais enzimas. O processo consiste no cultivo dos embriões em meio contendo uma enzima ligada ao cromossomo X, a co-enzima e um corante. Os embriões, após o cultivo, são classificados de acordo com a intensidade da coloração como sendo embriões machos os pouco corados e embriões fêmeas os fortemente corados (Monk e Handyside, 1988; Monk, et al., 1990).

Trabalhando com embriões murinos nos estádios de mórula a blastocisto, Williams, et al., (1983) obteve 72% das fêmeas e 57 % dos machos sexados corretamente. Monk e Handyside, (1988), utilizaram blastômeros retirados de embriões murinos de oito células, obtendo 91% das fêmeas e 100% dos machos

sexados corretamente. Apesar da maior acuidade obtida por esses autores, o fato de terem utilizado embriões de oito células torna difícil sua adaptação para bovinos, além de não garantir que resultados similares sejam obtidos em mórulas e blastocistos desta espécie. Como ainda não é conhecido o período exato da inativação do cromossomo X nas espécies domésticas, pode-se diagnosticar erroneamente embriões fêmeas como sendo machos devido à inativação precoce do cromossomo X.

A detecção do antígeno H-Y é um método imunológico de identificação do sexo que se baseia no fato de que somente os machos expressam o antígeno de histocompatibilidade Y (antígeno H-Y) na superfície da membrana celular. Para sexar os embriões têm sido utilizados os métodos de citotoxicidade e de imunofluorescência. No método citotóxico, os embriões são incubados na presença de anticorpos anti-H-Y e complemento. Após o cultivo, são considerados machos os embriões que sofrem degeneração, pois a ligação do antígeno H-Y com o anticorpo e o complemento levam à lise celular. Portanto, são considerados do sexo feminino os embriões que se desenvolvem *in vitro* (Gardón, et al., 2004). O método de imunofluorescência envolve inicialmente uma exposição dos embriões ao anticorpo primário (anti-H-Y), seguida por uma reação com um anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os embriões são então analisados quanto à presença ou ausência de fluorescência sob microscopia de fluorescência (Van Vliet, et al., 1989).

Segundo Van Vliet et al., 1989, além dos danos que causam aos embriões, a maior desvantagem dos métodos imunológicos de sexagem é que sua acuidade não excede os 87%. Algumas razões foram propostas para justificar esses baixos

resultados. Uma delas é que o antígeno H-Y seria um antígeno relativamente “fraco”, e os anticorpos gerados podem não ser suficientemente específicos, resultando em reações cruzadas com outros antígenos da superfície celular. A segunda é que no método de imunofluorescência os anticorpos secundários ocasionalmente mostram ligações não específicas, como por exemplo, com os debris celulares no espaço perivitelíneo. Além disso, o método é limitado pela subjetividade do julgamento através do grau de fluorescência do embrião (Van Vliet, et al., 1989).

São considerados como invasivos os métodos de análise citogenética e, análise molecular de seqüências Y-específicas.

A análise citogenética consiste em incubar as biopsias em meio de cultivo contendo colchicina, um inibidor da formação do fuso, que no processo de mitose sincroniza as células em metáfase. As células são hipotonizadas para permitir a dispersão dos cromossomos, são fixadas em lâminas e os cromossomos são corados. As metáfases são analisadas sob microscópio ótico para visualização dos cromossomos X e Y, no caso do macho ou de dois cromossomos X, no caso da fêmea.

A acuidade do teste é alta, aproximando-se de 100%, no entanto a dificuldade reside em se obter biopsias que forneçam metáfases de boa qualidade, ou seja, analisáveis. São encontradas na literatura porcentagens de embriões cujas biopsias que puderam ser analisadas pelo método citogenético de 60% (Picard, et al., 1985) e 68% (Betteridge, 1981).

Embora, a técnica de citogenética não tenha uma aplicação comercial, ela será sempre útil para confirmar os resultados de novas tecnologias a serem desenvolvidas para sexar embriões.

Os avanços no mapeamento do cromossomo Y permitiram o conhecimento de regiões macho-específicas o que possibilitou o uso de sondas e/ou “primers” na identificação do sexo de embriões. As primeiras técnicas utilizadas foram a “hibridização *in situ*” (Bondioli, et al., 1989) e o “dot blot” (Kirszenbaum, et al., 1990). Estas técnicas foram utilizadas até o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica de PCR simplificou as análises moleculares e abriu uma nova possibilidade para identificar o sexo em células embrionárias pela amplificação de seqüências específicas do DNA. .

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Para delimitar a região do DNA genômico que se deseja amplificar utiliza-se um par de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores) específicos que flanqueiam esta região.

Cada ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação a fita dupla de DNA se abre, na fase de anelamento os “primers” se hibridizam com as seqüências de DNA complementares e na fase de extensão envolve a adição de nucleotídios utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Como este ciclo é repetido algumas dezenas de vezes e dado que a cada ciclo a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra, a amplificação segue uma progressão geométrica. Este processo é feito em um termociclador. Após o PCR, a amostra é aplicada em gel de

agarose e submetida à eletroforese. A análise dos resultados é feita através do padrão de bandas visualizado no gel.

Para a sexagem de embriões bovinos, são utilizados um par de “primers” Y-específicos e um par de “primers” específicos para uma seqüência genômica presente nos dois sexos.

De acordo com Miller e Koopman, (1991), “primers” Y-específicos, derivados de seqüências repetitivas do cromossomo Y, tem uma grande utilidade para a sexagem de embriões, desde que permita a detecção do DNA do cromossomo Y em uma pequena quantidade de células do embrião.

Vários métodos, usando seqüências Y-específicos e co-amplificação com seqüências repetitivas de DNA autossômico em diferentes origens foram descritos na literatura para sexar embriões bovinos (Alves, et al., 2006; Wang, et al., 2006; Weikard, et al., 2006; Almodin, et al., 2005; Kageyama, et al., 2004; Alves, et al., 2003; Virta, et al., 2002; Park, et al., 2001; Hochman, et al., 1996; Bredbacka, et al., 1995; Bredbacka, et al., 1994; Jarrell, et al., 1994; Keefer, et al., 1994; Utsumi, et al., 1994; Kirkpatrick e Monson, 1993; Macháty, et al., 1993; Agrawala, et al., 1992; Peura, et al., 1991; Kirszenbaum, et al., 1990; Bondioli, et al., 1989), embriões murinos (Monk e Handyside, 1988; Yano, 1993) e embriões humanos (HANDYSIDE, et al., 1989; Jones, et al., 1987).

Todos esses estudos revelam que a acuidade do método é alta, em torno de 100%, e o número de células retiradas na biopsia não necessita ser elevado. Normalmente este número é inferior ao requerido para a análise citogenética, e está

em torno de 1 a 10 células (Virta, et al., 2002). Entretanto, é preciso ter cuidado no manuseio da biópsia. Os cuidados a serem tomados na retirada e acondicionamento da biópsia de um embrião visam minimizar os riscos de contaminação da amostra com DNA exógeno, o que poderia alterar os resultados da análise, sendo a maior causa do insucesso na maioria das amostras não sexadas. Roschlau, et al. (1997), relatam a experiência, em um período de 5 anos, com a sexagem de 7.826 embriões bovinos produzidos *in vivo*, utilizando a técnica de PCR com primers Y-específicos. Segundo os autores a acuidade do método aumentou de 83% em 1991 para 96% em 1997. De todos os embriões micromanipulados, 9% não puderam ter o sexo determinado. Estes autores comentam que as causas de erros na sexagem não se deveram somente ao método em si, mas também à manipulação dos embriões.

Para a visualização do material amplificado faz-se necessário um tempo adicional de 30 a 40 minutos para a realização da eletroforese. Com objetivo de eliminar esse período, outra estratégia para identificar o sexo em blastômeros é a utilização de uma sonda fluorogênica. Essa sonda é baseada em seqüência específica, consistindo de um oligonucleotídeo marcado com corante fluorescente. A acurácia da sexagem com o uso desta sonda foi de 99% e a eficiência de amplificação foi de 96% (Virta, et al., 2002). Embora, o método tenha eficiência e acurácia elevadas, ele necessita de pré-amplificação do DNA o que demanda mais tempo para se ter o resultado do diagnóstico.

A identificação do sexo de embriões, principalmente por PCR, esta inserida no conceito de diagnóstico pré-implantacional na reprodução assistida e encontra muitas aplicações. Essas aplicações vão desde a formação de bancos de embriões sexados ao uso da mesma biópsia para análise de outros marcadores genéticos

importantes. Além disso, a identificação do sexo de embriões, têm sido utilizada em laboratório para a avaliação da proporção de embriões do sexo masculino ou feminino nos diferentes sistemas *in vitro* de produção, bem como, em outras situações, nas quais o sexo do embrião é importante.

No tocante a formação de bancos, embriões congelados sexados proverão mais flexibilidade aos programas de produção por permitirem a comercialização de embriões sexados entre fazendas, regiões ou países, baseados nas recomendações da “International Embryo Transfer Society” (IETS) (Thibier e Nibart, 1995).

É possível também, biopsiar embriões previamente congelados e identificar o sexo destes com bastante eficiência antes da inovulação. Biopsias oriundas de embriões congelados, submetidas à identificação do sexo pela técnica de PCR, resultaram em 90,9% de embriões sexados corretamente (Garcia, et al., 1997). Esses resultados mostram que embriões congelados pertencentes a bancos existentes, poderão ser melhor aproveitados, quando o fator sexo tiver importância significativa no sistema produtivo em que forem utilizados.

3. OBJETIVO

Avaliar a influência da biopsia embrionária, *in vitro* e *in vivo*, sobre a taxa de prenhez em bovinos e verificar a eficiência e acurácia da identificação do sexo de embriões pela técnica de PCR em programa comerciais de TE e PIV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção *in vivo* dos Embriões (TE)

Este experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, em colaboração com a Empresa Guilberth Serviços Veterinários Ltda-Campinas/SP, no período entre janeiro/2006 a Março/2007.

4.1.1. Doadoras de embriões

Foram envolvidas no trabalho, fêmeas bovinas, como doadoras de embriões, com histórico reprodutivo, estado nutricional e fisiológico sob monitoramento, das raças Holandesa e Jersey, com idade entre 2 e 7 anos e em rotina normal de colheita de embriões à campo.

4.1.2. Superovulação (SOV)

Todas as fêmeas utilizadas no trabalho, após passarem por exames fisiológicos prévios, foram sincronizadas com um reforço de progesterona (P4) através da aplicação de um Dispositivo Intravaginal (EAZI-BREED™ CIDR® - Pfizer).

Para dar início à SOV, as doadoras receberam um implante CIDR®, o qual foi mantido por sete dias. No momento da aplicação do implante (D0), foi aplicado 2 mL de benzoato de estradiol (Estrogin® - Farmavet) por via intramuscular (IM). Quatro

dias após (D4) deu-se início ao tratamento de SOV, que constituiu da aplicação de 500 UI de FSH/LH (Pluset[®] - Calier), IM, durante quatro dias consecutivos em duas doses decrescentes, de 12 em 12 horas, iniciando com 36,4% da dose total no primeiro dia, 28,5% no segundo dia, 21,5% no terceiro dia e finalmente, 13,6% no quarto e último dia. No sétimo dia (D7), por ocasião da 7^a aplicação de FSH, foram aplicados 25mg de Prostaglandina F2 α (LUTALYSE[®], Pfizer), IM e foi removido o implante de progesterona. Entre 24 e 48 horas após a remoção do implante ocorreram as manifestações de sintomas de estro e as doadoras foram inseminadas artificialmente duas vezes, 12 e 24 horas após o início do estro (D9).

Foram utilizados na inseminação das doadoras, sêmen de touros com fertilidade comprovada, oriundos de centrais comerciais de sêmen.

4.1.3. Colheita e busca dos embriões

A colheita não cirúrgica dos embriões ocorreu no sétimo dia após a primeira inseminação. A lavagem uterina foi realizada com de cerca de 1 L de solução de colheita (Dulbecco PBS[®] - Nutricell), suplementada com estreptomicina (50 μ g/mL) e penicilina (100 UI/mL), através de sonda de silicone de duas vias. Todo o líquido coletado foi filtrado em filtro com poro de 80 μ m (Millipore[®]) para reter as estruturas recuperadas. Em seguida o conteúdo do filtro foi transferido para placas de petri 100 x 20 mm (TPP[®]).

Para a busca dos embriões, a solução colhida foi examinada com auxílio de um estereomicroscópio (SMZ 645[®] - Nikon), em 25x. As estruturas encontradas

foram lavadas, transferidas para outra placa com meio de manutenção de embriões estéril - TQC (TQC Holding Plus[®] – Nutricell), mantidas até o momento da classificação, micromanipulação e/ou transferência para as receptoras.

4.1.4. Seleção dos embriões

As estruturas foram avaliadas e classificadas quanto aos graus de desenvolvimento e de qualidade segundo as recomendações da IETS. Foram selecionados para o experimento embriões em estágio de desenvolvimento: Mc, Bi, BI e Bx com graus de qualidade excelente e bom (I) e regular (II).

4.2. Produção *in vitro* dos Embriões (PIV)

Este experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, em colaboração com a Empresa Gênese Biotecnologia Ltda – Brasília/DF e a Agropecuária Palma – Luziânia/GO, no período entre setembro/2006 a Março/2007. Foram utilizados neste experimento ovócitos aspirados de fêmeas bovinas da raça Gir, com idade entre 2 e 7 anos, em rotina de aspiração folicular para produção *in vitro* de embriões.

4.2.1. Obtenção dos ovócitos imaturos - Aspiração dos folículos

Os ovócitos foram obtidos pela Aspiração Folicular Transvaginal. O sistema consiste em uma agulha conectada a uma sonda transvaginal de 7,5 MHz, onde, os folículos medindo entre 2 e 6 mm são visualizados na tela de um equipamento de

ultra-sonografia e puncionados; fazendo com que os ovócitos sejam aspirados por um processo a vácuo. Em seguida, o material coletado foi pesquisado sob estereomicroscópio (Nikon®) e os complexos *cumulus ovocitos* (CCO) recuperados sofreram uma seleção inicial baseada no número de camadas de células de *cumulus* e nos aspectos morfológicos do citoplasma dos ovócitos. As estruturas selecionadas foram, então, lavadas e transportadas ao laboratório, em meio de transporte (MIV-T - Nutricell®), suplementado com penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) à temperatura de 35°C.

4.2.2. Maturação dos ovócitos *in vitro* (MIV)

Apenas os CCOs de qualidade I, II e III foram considerados viáveis e selecionados para o experimento. Os ovócitos foram classificados em uma escala de I a IV, considerando as características do *cumulus* e do citoplasma do ovócito.

Os CCOs selecionados foram separados por animal, lavados, e transferidos para uma placa contendo gotas de 50 a 150 µL, de meio de maturação (Meio de Maturação - Nutricell®), suplementado com 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH - Sigma®), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante – FSH (Sigma®), 1 µg/mL L-glutamina (Sigma®), 100 UI/mL penicilina (Sigma®) e 50 µg/mL estreptomicina (Sigma®), coberto com 2 mL de óleo mineral para embriologia (Sigma®), em grupos de até 30 ovócitos/gota ou conforme o número de ovócitos recuperados de cada animal e incubados por 24 horas a 39°C em atmosfera gasosa com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4.2.3. Fecundação *in vitro* (FIV)

Para a FIV, os ovócitos maduros foram separados em grupos conforme o número de ovócitos recuperados de cada animal, lavados e transferidos para gotas de 50 a 150 μL de meio de fecundação. O meio de fecundação utilizado foi o Nutricell[®], suplementado com penicilamina, hipotaurina, epinefrina e heparina (Nutricell[®]).

Sêmen de reprodutores das raças Holandesa e Gir Leiteiro, utilizado rotineiramente no laboratório, foi usado para fecundação dos ovócitos maduros. A seleção espermática foi realizada pelo método de Gradiente de Percoll (Parrish, et al., 1995), utilizando o meio de separação espermática consistindo de 1 mL de Percoll 45% e 1 mL de Percoll 90% (Gradiente de Percoll – Nutricell[®]). O sêmen descongelado em banho-maria à 35°C por 30 segundos, foi depositado sobre o Gradiente de Percoll e centrifugado à 700g por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o “pellet” foi retirado e ressuspensionado com 1 mL de meio de capacitação (Meio de Capacitação – Nutricel[®]) e centrifugado à 700g por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo então ressuspensionado com meio de fecundação. Após a avaliação da concentração, o sêmen foi adicionado na gota de fecundação em uma concentração final de 1×10^6 espermatozóides /mL.

Os CCOs e espermatozóides foram co-incubados por 18 horas em estufa a 39°C com umidade saturada, em atmosfera gasosa com 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da fecundação considerado D0.

4.2.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio líquido sintético do oviduto - SOF (SOF – Nutricell[®]) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais. Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados com remoção parcial das células do *cumulus* e transferidos para placas contendo gotas de 200 µL de meio SOF e colocados para cultivo. As placas foram preparadas um dia antes da sua utilização e estabilizadas em estufa de CO₂. Os embriões foram mantidos por 6,5 dias em incubadora com temperatura à 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa com 5% de CO₂ em ar.

As estruturas foram avaliadas em D2 para determinar a taxa de clivagem, em D6 e D7 para determinar a taxa desenvolvimento até o estágio de blastocisto, sendo D0 considerado o dia da fecundação.

4.2.5. Seleção dos embriões para biopsia

As estruturas foram avaliadas e classificadas quanto aos graus de desenvolvimento e de qualidade segundo as normas da IETS.

Foram selecionados para o experimento embriões nos estágios de BI, BL e BX com grau de qualidade I e II, aproximadamente 156 horas depois de colocados para cultivar (D6,5).

4.3. Micromanipulação para obtenção da biopsia embrionária

A biopsia consistiu na retirada de um fragmento do embrião com cerca de 10 a 20 células. Foi realizada através do uso de um micromanipulador constituído de dois braços de manipulação com movimentos X, Y e Z (M&M Micromanipulator[®]). Um braço foi usado para fixação da lâmina de corte e o outro para fixação da pipeta de aspiração que fixa o embrião. Ambos foram apoiados sobre uma base adaptada ao estereomicroscópio (Figura 1).



Figura 1 – Sistema de micromanipulação montado em estereomicroscópio.

Foram utilizadas lâminas de aço inox com ângulo de 15° graus (Bio-Cut Blades[®] - Feather), própria para microssecção embrionária (Figura 2) fixada a uma haste metálica articulada, para posicionamento no sistema. Para pipeta de fixação e posicionamento do embrião foi usado tubo de microhematócrito (Perfecta[®]), modelado de forma a permitir seu posicionamento no sistema de micromanipulação e conexão ao sistema de aspiração.



Figura 2 – Microlâmina e haste metálica articulada, destinadas a bipartição e microsecção de embriões.

Os embriões foram micromanipulados em placa de petri de 100 x 20 mm (TPP[®]) em gota de solução contendo 200 μ L de meio de manutenção - TQC[®].

Os embriões submetidos à biopsia foram fixados e posicionados à pipeta de fixação de forma que as células do botão embrionário ficaram próximas à pipeta e a blastocèle, em posição oposta. As secções para realização das biopsias foram realizadas abrangendo apenas a região do blastocèle, que resultaram em biopsias apenas com células do trofoblasto (Figura 3).

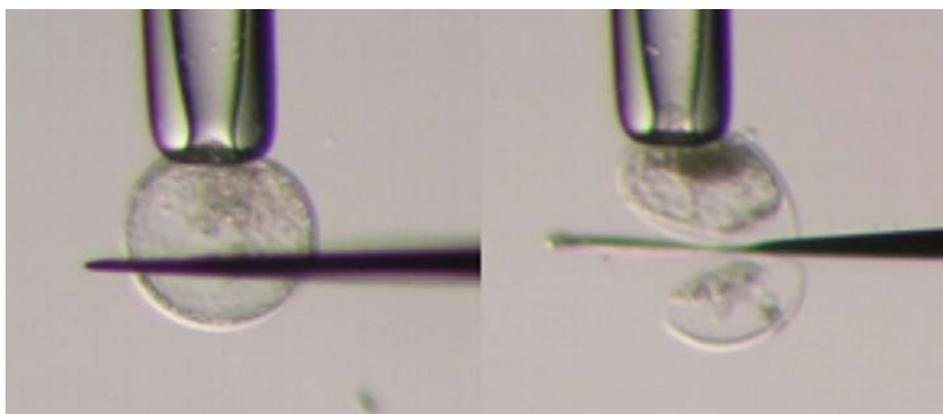


Figura 3 – Seqüência de procedimento de biopsia: Posicionamento e microsecção do embrião.

Os embriões de TE biopsiados foram mantidos em placas contendo meio de manutenção - TQC a temperatura ambiente por 3 horas. Este é o tempo necessário para os procedimentos de identificação do sexo. Em seguida foram acondicionados em palhetas de 0,25mL (IMV) e transferidos para receptoras. Os embriões de PIV biopsiados, retornaram para incubadora e foram mantidos em cultivo individualmente em placas de petri de 35 mm com óleo de silicone, em gotas contendo meio SOF, em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ e umidade saturada. Os embriões permaneceram em cultivo por 3 horas. Em seguida foram acondicionados em palhetas de 0,25mL (IMV) e transferidos para receptoras.

4.4. Identificação do sexo dos embriões

A identificação do sexo dos embriões foi realizada utilizando-se a técnica de PCR.

Para esse trabalho foi elaborado um Kit de soluções de reação para identificação do sexo dos embriões pela PCR, onde foram implementadas modificações a partir dos protocolos tradicionais. Essas alterações se deram principalmente nas concentrações dos reagentes e nas condições (tempo e temperatura) do processo de amplificação do DNA.

Além disso, a técnica de PCR por ser extremamente sensível demanda cuidados específicos, normalmente inexistentes em laboratórios de campo, podendo resultar na degradação dos reagentes e inutilização do Kit. Com o objetivo de minimizar essas perdas, o mesmo foi adaptado às condições de utilização em pequenos laboratórios nas fazendas. Para tanto, levou-se em consideração a

logística tais como, a apresentação, o acondicionamento no transporte até o local de utilização e estocagem.

As soluções do Kit foram distribuídas em tubos criogênicos de 1,5 ml.

- a) Solução 1 – Solução de Lise Celular, constituída de 1µL de Tampão de PCR 10X (Tris, 100mM, KCl, 500mM, MgCl₂.6H₂O, 20mM), 0,75µL de Proteinase K - Invitrogen® (20mg/ml) e 6,25µL de água, totalizando 8µL de solução/amostra. No Kit essa solução foi apresentada em quantidade de 100 amostras/tubo;
- b) Solução 2 – Solução de Amplificação, constituída de 1UI de Taq DNA Polimerase (Platinum TAQ DNA Polimerase® - Invitrogen), 800µM de dNTPs, 20ηM de *primers* A, 20ηM de *primers* B e Tampão PCR 1X, com volume final de 20µL /amostra. Apresentação dessa solução no Kit foi de 10 amostras/tubo.

Os componentes do Kit foram transportados congelados para as fazendas em botijões criogênicos com nitrogênio líquido (N₂) ou em gelo seco. Foram estocados em freezer à temperatura de -20°C ou em botijões criogênicos com N₂ à -196°C.

4.4.1. Lise celular

Sob estereomicroscópio as biopsias foram transferidas individualmente em volume máximo de 2µL para tubos de 200µL, contendo 8µL de Solução-1. Posteriormente as amostras foram transferidas para um termociclador (PT100® - MJ Research) sendo incubadas à temperatura de 55°C por 5 minutos e 95°C por 5 minutos.

4.4.2. Amplificação do DNA

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídios iniciadores (*primers*), sendo um par para amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y (Primers A – 5' CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT 3'; 5' TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG 3' - produz bandas com 210pb) (Bondioli, et al., 1989), e um par para amplificação de um loci repetitivo de microssatélite autossomal (Primers B – 5' AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTTCAA CAC GT 3', 5' AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA 3' - produz bandas com 280pb) (Ellis, et al., 1988).

Para a amplificação do material amostrado, foi adicionado às amostras 20 μ L de Solução-2. Em seguida as amostras foram submetidas à incubação no termociclador (PT100[®] - MJ Research) programado para executar 40 ciclos de amplificação do DNA. Cada ciclo compreendeu três etapas: desnaturação por 20 segundos a 94°C; anelamento por 30 segundos a 57°C e extensão por 30 segundos a 72°C.

Para detectar a existência de DNA nas amostras, o correto funcionamento da solução de amplificação e dos *primers*, bem como, a sua contaminação por DNA exógeno, foram utilizados em cada gel, três amostras com soluções controles, conforme descrito a seguir:

1. Solução controle “Y” – Constituída de 5 μ L de DNA de Macho bovino (3ng/ μ L), 1 μ L de Tampão PCR 10X e 4 μ L de água/reação.

2. Solução controle “autossômico” – Constituída de 5 μ L de DNA de Fêmea (3ng/ μ L), 1 μ L de Tampão PCR 10X e 4 μ L de água/reação.
3. Solução controle “negativo” – Constituída de 1 μ L de Tampão PCR 10X e 9 μ L de água/reação.

4.4.3. Eletroforese

Foram adicionados aos produtos da PCR, após a amplificação, 3 μ L de Azul de Bromofenol (Invitrogen[®]) para visualização da corrida de eletroforese. De cada amostra já com DNA amplificado foi retirado 20 μ L da solução e aplicado ao gel com agarose (Invitrogen[®]) a 1% em tampão TBE (TBE Buffer 10X - (Invitrogen[®]) e 1 μ L de Brometo de Ethidio (Invitrogen[®]). O gel foi submetido a um campo elétrico com 100 v, 30mA, 10W (eletroforese) por 35 minutos.

Para visualização das bandas produzidas, o gel foi levado a um transiluminador com luz ultravioleta.

4.4.4. Interpretação dos Resultados

Para interpretação dos resultados, as amostras que apresentaram apenas uma banda ou fragmento amplificado foram consideradas como fêmeas, pois apenas a banda referente aos *primers* autossômicos (280 pb) foi detectada. As amostras que tiveram duas bandas visualizadas foram consideradas como sendo de macho, pois tanto o fragmento autossômico de 280 pb como o fragmento específico do cromossomo Y, de 210 pb, foi amplificado pelos *primers*.

Os resultados foram validados se: 1) O controle negativo (sem DNA) não revelou nenhuma banda (como contaminação durante a manipulação); 2) o controle “Y”(com DNA de macho) mostrou a banda de 210 pb (fragmento específico do macho) e a banda de 280 pb (fragmento genômico) e 3) o controle autossômico (com DNA de fêmea) mostrou apenas a banda de 280 pb (Figura 4).

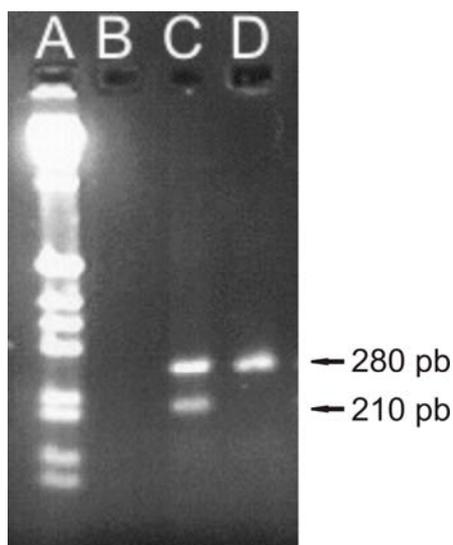


Figura 4 – Gel de agarose mostrando os controles: A) Marcador; B) Controle negativo, sem DNA; C) Controle positivo com DNA de macho; D) Controle positivo com DNA de fêmea.

4.5. Inovulação dos embriões

Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25mL, em solução de manutenção e posicionados na coluna central da palheta. A transferência transcervical dos embriões foi realizada com inovulador modelo IMV[®], sete dias após o cio (D-7).

4.6. Diagnóstico de gestação e identificação do sexo fetal

As receptoras de embriões foram examinadas por via transretal com utilização de equipamento de ultra-sonografia para diagnóstico de gestação 30 dias após as inovulações.

Aos 60 dias após as inovulações, as receptoras diagnosticadas como prenhes foram novamente avaliadas por ultra-sonografia para confirmação da prenhez e verificação do sexo fetal.

4.7. Delineamento experimental

4.7.1. Experimento 1 - Efeito da Biopsia em embriões produzidos *in vivo* sobre a taxa de prenhez

Foram utilizados neste experimento 609 embriões bovinos produzidos *in vivo*. Em cada colheita, os embriões foram selecionados e distribuídos aleatoriamente nos grupos.

Grupo TE biopsiados – TE-B: 380 Embriões nos estádios de Mc, Bi, BI e Bx, com qualidade I e II, foram biopsiados e mantidos 3hs a temperatura ambiente, em meio de manutenção - TQC e posteriormente transferidos para receptoras síncronas.

Grupo TE controle – TE-C: O grupo controle foi constituído por 229 embriões intactos, nos estádios de Mc, Bi, BI e Bx, com qualidade I e II, e submetidos às mesmas condições de ambiente dos embriões biopsiados.

As receptoras inovuladas com embriões desses grupos, foram avaliadas aos 30 dias quanto às taxas prenhez, e aos 60 dias quanto a Perda Embrionária e Fetal/Precoce (PEFP) e identificação do sexo fetal.

4.7.2. Experimento 2 - Efeito da biopsia em embriões produzidos e cultivados *in vitro* sobre a taxa de prenhez.

Foram utilizados neste experimento 318 embriões bovinos produzidos *in vitro*. Em cada dia de manipulação, os embriões foram selecionados e distribuídos aleatoriamente nos grupos.

Grupo PIV Biopsiados – PIV-B: 91 embriões nos estádios de BI e BL e BX, com qualidade I e II, produzidos *in vitro* com aproximadamente 156hs de desenvolvimento (D6,5) foram biopsiados e mantidos em cultivo individualmente em meio SOF, a 39°C, 5% de CO₂ e umidade saturada por 3hs. Após esse período, foram transportados para fazenda e transferidos para receptoras síncronas.

Grupo PIV controle – PIV-C: o grupo controle foi constituído por 227 embriões intactos, nos estádios de BI, BL e BX, com qualidade I e II, da mesma manipulação de PIV. Foram submetidos às mesmas condições de ambiente e cultivo dos embriões biopsiados. Após esses procedimentos, foram transportados para fazenda e transferidos para receptoras síncronas, da mesma forma que os embriões biopsiados.

As receptoras inovuladas, pertencentes a esses grupos foram aos 60 dias, avaliadas quanto à taxa prenhez e confirmação do sexo através da ultra-sonografia.

4.7.3. Experimento 3 – Eficiência e acurácia da técnica de identificação do sexo por PCR em embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*.

De 380 biopsias embrionárias oriundas do grupo TE-B, 271 foram submetidas à técnica de PCR para identificação do sexo e avaliadas em gel de agarose. As demais foram usadas para avaliar a viabilidade embrionária. As 91 biopsias embrionárias oriundas do grupo PIV-B, foram igualmente submetidas à técnica de PCR para identificação do sexo e avaliadas em gel de agarose.

A eficiência foi determinada pela percentagem de embriões com sexo identificado pela PCR em relação ao número total de embriões submetidos ao processo. A acurácia foi determinada pela percentagem de embriões com sexo identificado por Ultra-som coincidente com a identificação do sexo pela PCR.

4.8. Análise Estatística

As taxas de concepção, os efeitos dos diferentes estágios embrionários na viabilidade embrionária, bem como, os resultados de identificação do sexo nos diferentes grupos foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação do sexo do embrião previamente à sua transferência para a receptora é uma estratégia fundamental para a produção animal em sistemas em que a TE e PIVE são utilizados como métodos de multiplicação. Isso porque possibilita a melhor utilização das receptoras, transferindo apenas os embriões com sexo desejado para o tipo de exploração pecuária. A eficiência da técnica de identificação do sexo de embriões por PCR melhorou consideravelmente e com isso, a confiabilidade dos resultados que chegaram a 90 (Thibier e Nibart, 1995) e 95% (Alves, et al., 2003; Shea, 1999). Portanto, para que esse procedimento seja utilizado rotineiramente nos programas de TE e PIV, é necessário que seja estabelecido um sistema que não só seja eficiente na identificação do sexo mas que também não afete a viabilidade dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Embora a utilização da identificação do sexo de embriões tenda a diminuir com a evolução da sexagem de sêmen, o sistema estudado na presente dissertação poderá ser utilizado para o diagnóstico pré-implantação de outras características.

Visando avaliar a viabilidade e eficiência da técnica utilizada neste estudo, foram comparadas as taxas de gestação de embriões biopsiados e embriões intactos, produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Os dados referentes à taxa de gestação de embriões produzidos *in vivo* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez e perda embrionária/fetal de embriões bovinos produzidos *in vivo*.

Grupos	Embriões			
	N total	Prenhez 30 d n (%)	Prenhez 60 d n (%)	PEFP
TE-B	380	218(57,36)	206(54,21)	12 (5,50)
TE-C	229	132(57,64)	128(55,89)	6 (4,45)

TE-B, Embriões biopsiados; TE-C, Embriões intactos usados como controle; PEFP, Perda embrionária/Fetal Precoce. Não apresentou diferença entre os grupos ($P > 0.05$).

A taxa de prenhez aos 30 e 60 dias, assim como a percentagem de PEFP foi semelhante ($P > 0,05$) para os embriões dos grupos TE-B e TE-C. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Carbonneau, et al., (1997) e Lopes, et al., (2001) e sugerem que a biopsia para identificação do sexo não afeta a viabilidade do embrião produzido *in vivo* quando esse é de boa qualidade.

A PEFP é a perda embrionária (≤ 42 dias) e/ou fetal (> 42 dias) observada durante as primeiras semanas de gestação nos bovinos (Sartori, 2004). Essa perda pode ocorrer devido a fatores diversos, principalmente à qualidade do embrião e condição uterina da receptora. Com a utilização da ultra-sonografia é possível detectar essas perdas (Wolf e Gabaldi, 2002).

Neste estudo foi observado que não houve diferença na PEFP entre os grupos de embriões TE-B e TE-C (Tabela 1). Além disso, os resultados aqui mostrados são similares aos encontrados na literatura, onde os autores relatam e consideram normais perdas $\leq 10\%$ em bovinos (Sartori, 2004; Wolf e Gabaldi, 2002). É importante ressaltar que um dos fatores responsáveis pela manutenção da viabilidade é a qualidade dos embriões submetidos à biopsia, visto que no presente experimento, assim como nos descritos na literatura, apenas embriões de qualidade

I e II foram utilizados. Portanto é possível que esse procedimento possa afetar a taxa de PEFP se embriões de pior qualidade forem biopsiados.

Por outro lado, no presente estudo, foi observado influência dos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário na taxa de gestação aos 30 dias (Tabela 2).

Tabela 2- Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez aos 30 dias em embriões bovinos produzidos *in vivo* em diferentes estágios de desenvolvimento.

GRUPOS	Receptoras prenhes/ N total (%)			
	Mc	Bi	BI	Bx
TE-B	88/170 (51,76) ^{aA}	20/27 (74,07) ^{bA}	95/158 (60,12) ^{abA}	15/25 (60,00) ^{abA}
TE-C	86/157 (54,77) ^{aA}	9/17 (52,94) ^{aA}	32/49 (65,30) ^{aA}	5/6 (83,33) ^{aA}

TE-B, Embriões biopsiados produzidos *in vivo*; TE-C, Embriões intactos – Controle. Mc, Mórula compacta; Bi, Blastocisto inicial; BI, Blastocisto e Bx, Blastocisto expandido. Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha e valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferiram ($P < 0,05$).

Embriões biopsiados nos estágios de Mc, Bi, BI e Bx, quando comparados aos embriões do grupo controle (TE-C), nos mesmos estágios de desenvolvimento embrionários, não mostraram diferenças ($P > 0,05$) com relação à taxa de prenhez. Entretanto, quando comparados dentro do grupo biopsiado foi observado uma maior taxa de prenhez aos 30 dias de embriões no estágio de BI com relação aos embriões no estágio de Mc.

Os embriões em estágio de Mc são mais jovens (menor nº de células), apresentam maior susceptibilidade a alterações de temperatura e principalmente, encontram-se no processo de compactação, fundamental para a distribuição das células que vão construir o Botão embrionário e células que vão formar o trofoblasto.

Além disso, a obtenção da biopsia em embriões nesse estágio exige maior habilidade técnica.

Esses aspectos podem explicar a maior susceptibilidade desses embriões frente a manipulação *in vitro* quando comparados aos blastocistos.

Já os blastocistos, têm os dois tipos celulares bem definidos, o que permite um melhor posicionamento do embrião. É possível remover apenas as células do trofoblasto, preservando completamente o Botão embrionário. Essa vantagem aliada a menor susceptibilidade dos blastocistos à manipulação *in vitro* poderiam explicar os melhores resultados obtidos com os embriões dessa categoria.

É sabido que há perdas e danos causados às células embrionárias durante a micromanipulação. Segundo Heyman, (1985) 50% das células são perdidas durante a micromanipulação. Outros autores reportaram perdas em torno de 14% (Skrzyszowska e Smarag, 1987) e entre 15 e 18% (Chesne, et al., 1985). Entretanto, a micromanipulação de embriões tem demonstrado que os mesmos, apesar da redução no seu número celular, são capazes de se desenvolver (Willadsen; Polge, 1981; Ozil, 1982) e apresentam ainda aumento de 30% na massa celular remanescente, após 24 horas de cultivo (Nibart, et al., 1988). Conforme relatado anteriormente, hemi-embriões com 30 a 40% da massa celular total têm capacidade de se reorganizar e desenvolver em um novo indivíduo (Lamberth, et al., 1983; Ozil, 1982; Ozil, et al., 1982; Williams, et al., 1983).

Um dos objetivos do presente estudo foi também avaliar o efeito da biopsia sobre a taxa de gestação de embriões PIV. A demanda pela identificação do sexo para esse tipo de embrião é muito maior do que para o embrião TE. O maior número

de embriões gerados em uma manipulação de PIV associada à menor taxa de prenhez e a produção de maior número de embriões machos exige maior racionalização das receptoras, incrementando ainda mais a necessidade de transferir somente os embriões com o sexo desejado. Alguns estudos, utilizando embriões biopsiados produzidos *in vitro* mostraram resultados que variaram de 30 a 55% de gestação (Carbonneau, et al., 1997; Roschlau, et al. 1997; Kirkpatrick e Monson, 1993; Macháty, et al. 1993, Alonso, et al., 2006).

Para atender a esse objetivo e também, verificar aplicabilidade do processo em sistema comercial de produção, 318 embriões produzidos *in vitro* foram utilizados, sendo destes, 91 biopsiados e os demais usados como controle. Os índices de prenhez, observados nesse experimento estão apresentados na Tabela 3 e ficaram a baixo da média geral de embriões PIV (35%). No entanto, não houve diferença na taxa de gestação quando comparados os dois tratamentos. Esse fato é explicado por uma deficiência momentânea observada no manejo das receptoras durante o período do experimento.

Tabela 3 - Efeito da biopsia sobre a taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

GRUPOS	EMBRIÕES	
	N total	Prenhez aos 60 dias, n (%)
PIV-B	91	24(26,37)
PIV-C	227	45(19,82)

PIV-B, Embriões produzidos *in vitro* biopsiados; PIV-C, embriões produzidos *in vitro* intactos – Controle. Não houve diferença entre os grupos (P<0,05).

Tem sido demonstrado, em vários estudos que o embrião PIV possui qualidade inferior sendo, portanto menos viável que o embrião produzido *in vivo*.

Várias características tais como maior vacuolização, desenvolvimento mais lento, maior opacidade (Sirard e Lambert, 1985), menor número de células embrionárias (Greve, et al., 1993), menor densidade de mitocôndrias e maior densidade de lipídeos (Crosier, et al., 2000; Crosier et al., 2001) tem sido identificados nos embriões *in vitro*, o que justifica a sua menor viabilidade. Dessa forma, era esperado que esses embriões fossem mais afetados pela biopsia do que os embriões *in vivo*. Entretanto, apesar da taxa de prenhez ter sido baixa no presente estudo, ela foi semelhante para ambos os grupos, sugerindo que a retirada de células não comprometeu a viabilidade. Por outro lado, é possível que uma compensação possa ter ocorrido. Estudos relatam que embriões bovinos produzidos *in vitro*, que num processo de micromanipulação, tenham sua membrana pelúcida removida ou perfurada, resultem numa maior taxa de prenhez (Park, et al., 2001).

Quando o efeito da biopsia em diferentes estágios embrionários foi avaliado sobre a taxa de prenhez, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos (Tabela 4). O estágio de Mc não foi considerado, pois no momento em que os embriões foram retirados da PIV, com cerca de 156h de cultivo (D6,5), a maior parte deles já se encontrava nas fases de blastocisto. Está bem estabelecido que biopsias feitas apenas com células do trofoblasto podem causar menores danos ao embrião. Os resultados da Tabela 4 mostram que mesmo blastocistos mais jovens podem ser biopsiados, sem que a viabilidade desses seja afetada. Deve-se levar em conta, entretanto, que a experiência e a habilidade do técnico não só para avaliar a idade e a qualidade dos embriões a serem biopsiados, mas também, para realizar a micromanipulação, são fundamentais para o sucesso da técnica.

Tabela 4 - Efeito da fase de desenvolvimento do blastocisto biopsiado sobre a taxa de prenhez aos 60 dias.

GRUPOS	Receptoras prenhes/ N total (%)		
	Bi	BI	Bx
PIV-B	5/20 (25,00)	10/41 (24,39)	9/30 (30,00)
PIV-C	16/79 (20,51)	17/91 (18,68)	8/39 (20,51)

PIV-B, Embriões produzidos *in vitro* biopsiados; PIV-C, embriões produzidos *in vitro* intactos – Controle. Bi, Blastocisto inicial; BI, Blastocisto e Bx, Blastocisto expandido. Não houve diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

No presente estudo foi observado que tanto em embriões produzidos *in vitro* como *in vivo*, a biopsia não afeta a viabilidade do embrião, avaliada pela taxa de prenhez. Entretanto, essa técnica só pode ser indicada se o procedimento para identificação do sexo for eficiente e acurado.

A eficiência pode ser definida pelo número de embriões com sexo identificado, dividido pelo número de tentativas efetuadas (Thibier e Nibart, 1995).

No presente estudo os resultados mostram que a eficiência média em ambos os experimentos, foi de 93% (Tabela 5), e está em concordância com os 95% reportados por Thibier e Nibart, (1995).

Tabela 5 – Eficiência da identificação do sexo de embriões de acordo com o experimento

GRUPOS	EFICIÊNCIA – PCR		
	N	Sexo identificado	Sexo não identificado
TE-B	271	243(89,66%)	28 (10,33%)
PIV-B	91	87(95,60%)	4 (4,39%)

TE-B, Embriões produzidos *in vivo* biopsiados; PIV-B, Embriões produzidos *in vitro* biopsiados; Sexo identificado, amostras que apresentaram bandas bem definidas permitindo a indentificação do sexo; Sexo não identificado, as amostras não apresentaram bandas visíveis no gel ou apresentaram bandas fracas que dificultaram a visualização.

Dos 271 embriões biopsiados produzidos *in vivo*, 243 amostras tiveram o sexo identificado (89,66%). Das 28 amostras que não tiveram o sexo identificado, 13 não apresentaram bandas no gel e 15 apresentaram bandas fracas no gel, causando dúvidas na leitura.

Para os embriões produzidos *in vitro* (n= 91), os resultados mostraram uma eficiência de 95,60% (Tabela 5), sendo que os não tiveram o sexo identificado apresentaram amplificação fraca com visualização indefinida.

A experiência técnica do executor da biopsia e posterior manipulação da mesma é um fator importante que pode interferir no índice de eficiência da técnica. A pouca habilidade manual do técnico em função de pouco treinamento pode provocar várias falhas, tais como: a) a não colocação da biopsia no tubo de reação resultando na não amplificação do DNA; b) a maceração da biopsia na microsecção podendo provocar danos ou perda de parte das células e c) a falta de cuidado na lavagem da lâmina entre uma biopsia e outra acarretando a contaminação de uma amostra com DNA de outra. Além disso, o mau acondicionamento do Kit pode provocar a

degradação de alguns de seus componentes, não permitindo a realização das reações enzimáticas necessárias para amplificação do DNA. Isso pode causar a formação de bandas fracas dificultando a visualização das mesmas e conseqüentemente a interpretação dos resultados. Para se obter um bom diagnóstico (Figura 5) é necessário, portanto, tomar os cuidados relativos aos diferentes aspectos mencionados anteriormente.

Quanto à precisão ou acurácia da técnica, está definida como sendo o número de bezerros nascidos ou fetos submetidos à identificação do sexo por ultra-som, dividido pelo número de embriões que foram avaliados na técnica de PCR. De acordo com resultados reportados na Tabela 6, a média de acurácia nos tratamentos foi de 93,46% comparado aos resultados de ultra-som.

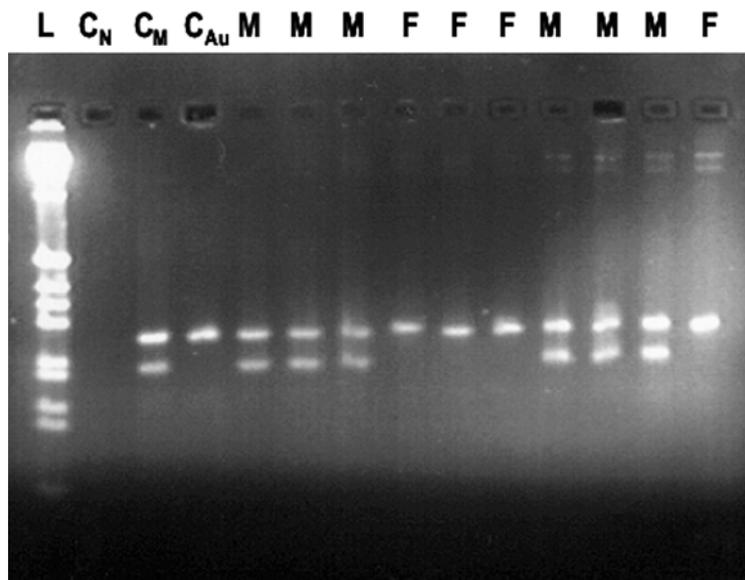


Figura 5 – Gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de biópsias embrionárias: L) marcador de peso molecular; C_N, C_M e C_{Au},) controles; M) embriões machos e F) embriões fêmeas.

Os embriões relativos às 271 biopsias embrionárias oriundas do grupo TE-B submetidas à técnica de PCR foram transferidos para receptoras síncronas e resultaram em 142 gestações aos 30 dias e 133 aos 60 dias. Quando foram avaliadas quanto ao sexo por ultra-som aos 60 dias de gestação, 124/133 (93,23%) apresentaram sexo coincidente com o diagnosticado pela técnica de PCR e nove inconsistente ou errados. Os 15 embriões que apresentaram bandas fracas desse grupo não foram avaliados por não resultarem em receptoras prenhes.

No experimento PIV-B, 91 receptoras inovuladas com embriões biopsiados foram avaliadas aos 60 dias de gestação e 24 delas diagnosticadas como prenhes. Destas, 20 tiveram sexo identificado pela PCR, sendo que 19(65%) apresentaram sexo coincidente quando avaliados por ultra-som.

Tabela 6 - Acurácia da técnica de PCR para identificação do sexo comparada a sexagem por ultra-som.

GRUPOS		ACURÁCIA		
		PCR	Sexo 60 dias (Ultra-som)	
		N	Fêmea	MACHO
TE-B 124/133 (93,23%)	Macho	44	7	37 (84%)
	Fêmea	89	87 (97,7%)	2
	Questionável F	0	-	-
	Questionável M	0	-	-
PIV-B 19/20 (95%)	Macho	12	0	12 (100%)
	Fêmea	8	7 (87,7%)	1
	Questionável F	4	2	2
	Questionável M	0	-	-
Média dos grupos: 144/153(94,11%)				

TE-B, Embriões produzidos *in vivo* biopsiados; PIV-B, Embriões produzidos *in vitro* biopsiados; Questionável: são amostras que após a PCR não apresentaram bandas visíveis ou apresentaram bandas fracas e com visualização não definida no gel.

As falhas mostradas na Tabela 6 podem ter sido provocadas pelos fatores listados anteriormente, como também, por amostras de células contendo DNA degradado, não permitindo a ocorrência das reações enzimáticas adequadas e conseqüentemente a amplificação do DNA.

Os resultados da identificação do sexo dos conceptos não foram verificados naquelas gestações que foram a termo. Entretanto, as freqüências de machos e fêmeos, observadas nas avaliações pela PCR, levando-se em consideração o índice de erro observado, foram de encontro com os resultados esperados, em ambos os experimentos.

Para finalizar, 95% (TE) e 90% (PIV) das biopsias embrionárias analisados pela PCR tiveram o sexo identificado com 93% de eficiência. O tempo necessário de 3 a 4 horas, utilizado para os procedimentos de micromanipulação e identificação do sexo não interferiram na viabilidade desses embriões resultando em índices normais de gestação.

A capacitação técnica dos profissionais para obtenção da biopsia, processamento da mesma e leitura dos resultados, bem como, a disponibilidade do kit de PCR no mercado, são fundamentais para uma boa eficiência da identificação do sexo de embriões por esse método, em programas comerciais.

É importante salientar, no contexto do presente trabalho, que o diagnóstico pré-implantacional para várias outras características vêm ganhando importância na reprodução assistida. A identificação do sexo, os estudos de expressão gênica

diferencial, a identificação de QTL (Quantitative Trait Loci) e de marcadores genéticos específicos são ferramentas da atual tecnologia de genética molecular (Garcia e Porto-Neto, 2006). A micromanipulação de embriões e a PCR são técnicas que possibilitarão a disponibilização dessas ferramentas, para utilização ainda na fase embrionária, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética/produção animal. O sistema ora avaliado pode ser ampliado para esse fim, além de ser associado à técnica de bipartição de embriões já de domínio público.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, de acordo com os resultados aqui apresentados, a técnica de micromanipulação de embriões objetivando a retirada de biopsia para identificação do sexo não interfere na viabilidade dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. O sistema proposto para a identificação do sexo a campo, de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, é eficiente e preciso, e pode ser difundido junto aos técnicos que prestam serviços em programas comerciais de TE e PIV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWALA, P. L.; WAGNER, V. A.; GELDERMANN, H. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 969-978, 1992.

ALMODIN, C. G.; MORON, A. F.; KULAY, L., JR., et al. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertil Steril**, v. 84, n. 4, p. 895-899, 2005.

ALONSO, R. V.; HELLÚ, J. A. A.; ARDAIS, D. B., et al. Aplicação comercial em larga escala da sexagem de embriões produzidos *in vitro* por análise de DNA. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Supl 1), p. 440, 2006.

ALVES, B. C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F.; TEIXEIRA, C. M., et al. Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1415-1419, 2003.

ALVES, B. C.; MAYER, M. G.; TABER, A. P., et al. Molecular characterization of a bovine Y-specific DNA sequence conserved in taurine and zebu breeds. **DNA Seq**, v. 17, n. 3, p. 199-202, 2006.

BETTERIDGE, K. J. An historical look at embryo transfer. **J Reprod Fertil**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 1981.

BONDIOLLI, K. W.; ELLIS, S. B.; PRYOR, J. H., et al. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 95-104, 1989.

BREDBACKA, P.; KANKAANPAA, A.; PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. **Theriogenology**, v. 44, n. 2, p. 167-176, 1995.

BREDBACKA, P.; VELMALA, R.; PEIPPO, J., et al. Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos. **Theriogenology**, v. 41, n. 5, p. 1023-1031, 1994.

CARBONNEAU, G.; MORIN, N.; DUROCHER, J., et al. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 266, 1997.

CHESNE, P.; HEYMAN, Y.; CHUPIN, D., et al. Freezing cattle demi-embryos: influence of a period of culture between splitting and freezing on survival. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 63-75, 1985.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol Reprod.** V. 62, n. 5, p. 1459-1465, 2000.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol Reprod.** V. 64, n. 5, p. 1375-1385, 2001

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; ARAUJO JR., J. P., et al. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. (Supl 1), p. 205-212, 2006.

ELLIS, S. B.; BONDIOLLI, K. W.; WILLIAMS, M. E., et al. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 242, 1988.

GARDON, J. C.; AGUERA, S.; CASTEJON, F. Sexing *in vitro* produced bovine embryos, at different stages of development, using rat H-Y antiserum. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 35-43, 2004.

GARCIA, J. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; PUPIM, F., et al. Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. **Theriogenology**. v. 47, 1, 268, 1997.

GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. R. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. (Supl 1), p. 197-203, 2006.

HANDYSIDE, A. H.; PATTINSON, J. K.; PENKETH, R. J., et al. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, v. 1, n. 8634, p. 347-349, 1989.

HERR, C.; HOLT, N.; PIETRZAK, U., et al. Increased number of pregnancies per collected embryo by bissection of blastocyst stage ovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, n. p. 244, 1990.

HOCHMAN, D.; ZARON, Y.; DEKEL, I., et al. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, n. 6, p. 1063-1075, 1996.

JARRELL, V. L.; LEWIN, H. A.; MCCOY, G. C., et al. Prediction of multiple genotypes in bovine embryos by PCR-RFLP analysis. **Theriogenology**, v. 41, n. p. 222, 1994.

JONES, K. W.; SINGH, E. L.; EDWARDS, R. G. The use of probes for the Y chromosome in preimplantation embryo cell. **Hum Reprod**, v. 2, n. 5, p. 439-445, 1987.

KAGEYAMA, S.; YOSHIDA, I.; KAWAKURA, K., et al. A novel repeated sequence located on the bovine Y chromosome: its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. **J Vet Med Sci**, v. 66, n. 5, p. 509-514, 2004.

KEEFER, C. L.; SCOTT, B.; KOPPANG, R., et al. Male/female sex ratio and survival following embryo biopsy of in vitro produced bovine embryo. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 225, 1994.

KIRKPATRICK, B. W.; MONSON, R. L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **J Reprod Fertil**, v. 98, n. 2, p. 335-340, 1993.

KIRSZENBAUM, M.; COTINOT, C.; LEONARD, M., et al. Diagnosis of the sex of bovine embryos using molecular biology. **Reprod Nutr Dev**, v. Suppl, n. 1, p. 125-132, 1990.

KRATZER, P. G. Expression of maternally and embryonically derived hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) activity in mouse eggs and early embryos. **Genetics**, v. 104, n. 4, p. 685-698, 1983.

KUZNETSOV, V. E. [Determination of sex in 7-day bovine embryos after microsurgical division]. **Tsitol Genet**, v. 25, n. 1, p. 11-13, 1991.

LAMBERTH, V. A.; LOONEY, C. R.; VOELKEL, S. A., et al. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twins calves. **Theriogenology**, v. 20, n. 1, p. 85-95, 1983.

LEWIS, I. M. Splitting cattle embryos commercially: The effects of sucrose, embryo stage and the duration between embryo recovery and bisection. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 237, 1994.

LOPES, R. F.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T., et al. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1383-1392, 2001.

MACHÁTY, Z.; PÁLDI, A.; CSÁKI, T., et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. **J Reprod Fertil**, v. 98, n. p. 467-470, 1993.

MONK, M.; HANDYSIDE, A. H. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 1, p. 365-368, 1988.

MONK, M.; HANDYSIDE, A.; MUGGLETON-HARRIS, A.; WHITTINGHAM, D. Preimplantation sexing and diagnosis of hypoxanthine phosphoribosyl transferase deficiency in mice by biochemical microassay. **Am J Med Genet.** v. 35, n. 2, p. 201-205, 1990.

MONK, M.; HARPER, M. X-chromosome activity in preimplantation mouse embryos from XX and XO mothers. *J Embryol Exp Morphol.*, v. 46, p. 53-64, 1978.

NIBART, M.; SRIPONGPUN, S.; CEDDEN, F., et al. Histological study of bovine intact and demi-embryos. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 283, 1988.

OZIL, J. P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. **J. Reprod. Fert.**, v. 6, p 463-468, 1983.

OZIL, J. P. La gemellite experimentale. **Separata de Journées D' Information U N C E I A; Jouy-en-Josas, Institut Technique de L'Elevage Bovin, INRA**, p. 85-87, 1982.

OZIL, J. P.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. **Vet Rec**, v. 110, n. 6, p. 126-127, 1982.

PARK, J. H.; LEE, J. H.; CHOI, K. M., et al. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1843-1853, 2001.

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**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PEURA, T.; HYTTINEN, J. M.; TURUNEN, M., et al. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 547-555, 1991.

PICARD, L.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. **Vet Rec**, v. 117, n. 23, p. 603-608, 1985.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reprod Fertil Dev**, v. 16, n. 2, p. 33–46, 2004.

RAO, K. B.; TOTEY, S. M. Sex determination in sheep and goats using bovine Y-chromosome specific primers via polymerase chain reaction: potential for embryo sexing. **Indian J Exp Biol**, v. 30, n. 9, p. 775-777, 1992.

REICHENBACH, H.-D.; SCHWARTZ, J.; WOLF, E., et al. Effects of embryo developmental stage, quality and short-term culture on the efficiency of bovine embryo splitting. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 224, 1998.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F., et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, SP Livraria Varela, 2001, p. 127-177.

ROSCHLAU, K.; ROSCHLAU, D.; ROSELIUS, R., et al. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 273, 1997.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. (Supl 1), p. 35-50, 2004.

SEIDEL, G. E. Applications of microsugery to mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 23-34, 1982.

SHEA, B. F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 841-854, 1999.

SIRARD, M.A.; LAMBERT, R.D. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biol Reprod**, V.33, n. 2, p. 487-494, 1985

SKRZYSZOWSKA, M.; SMARAG, Z. Effect of splitting on cell losses and the quality of bisected embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 276, 1987.

SMITH, A. L. Blastocyst culture in human IVF: the final destination or a stop along the way? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 97-107, 2002.

TAYLOR, S. T. C. S.; MOORE, A. J.; THIESSEN, R. B. Food efficiency in traditional and sex controlled systems of beef production. **Anim Prod**, v. 40, p. 401-440, 1985.

THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 71-80, 1995.

UTSUMI, K.; TAKEDA, H.; YAMADA, M., et al. Sexing of bovine embryos by PCR using bovine SRY primer. **Theriogenology**, v. 41, n.1, p. 323, 1994.

VAN VLIET, R. A.; VERRINDER GIBBINS, A. M.; WALTON, J. S. Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**. v. 32, n. 3, 421-438, 1989

VIRTA, J.; MARKOLA, J.; PEIPPO, J., et al. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2229-2236, 2002.

WANG, D.; CHENG, J. H.; ZHU, H. B., et al. [The study on the technique of sexing bovine pre-implantation embryos with two-temperature gradient multiplex PCR]. **Yi Chuan**, v. 28, n. 3, p. 334-338, 2006.

WEIKARD, R.; PITRA, C.; KUHN, C. Amelogenin cross-amplification in the family Bovidae and its application for sex determination. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 10, p. 1333-1337, 2006.

WILLADSEN, S. M.; POLGE, C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. **Vet Rec**, v. 108, p. 211-213, 1981.

WILLIAMS, T. J.; ELSDEN, R. P.; SEIDEL JR, G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 521-531, 1983.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. Acompanhamento ultra-sonográfico da gestação em grandes animais - Parte II. **Ciê n Agr Saude**, v. 2, n. 2, p. 84-89, 2002.

YANO, T. Sexing of in vitro-fertilized preimplantation mouse embryos by the PCR method. **Jpn Hum Genet**, v. 38, n. 3, p. 277-288, 1993.