

ISSN 1678-2518

dezembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 155

Tempo de Maturação Ovocitária, Taxa de Desenvolvimento e a Proporção Sexual dos Embriões Bovinos Produzidos in vitro

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Maria Gabriela Tavares Rheingantz
Priscila Santos e Silva
Bruna Santos
Ledi Anghinoni
Margot Alves Nunes Dode

Pelotas, RS
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária-Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio
Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi,
Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja, Beatriz Marti Emygdio

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e capa: Juliane Nachtigall (estagiária)

1ª edição
1ª impressão (2011): 100 exemplares

Todos os direitos reservados
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui
violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Tempo de maturação ovocitária, taxa de desenvolvimento e a proporção sexual dos
embriões bovinos produzidos in vitro / Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro et al. –
Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011.

21 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1678-
2518, 155)

1. Embrião bovino – Desenvolvimento. 2. Maturação in vitro. 3. Proporção sexual.
4. Ciência Veterinária. I. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli. II. Série.

CDD 636.0892646

© Embrapa

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	13
Conclusão	16
Referências	17

Tempo de Maturação Ovocitária, Taxa de Desenvolvimento e a Proporção Sexual dos Embriões Bovinos Produzidos in vitro

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro¹

Maria Gabriela Tavares Rheingantz²

Priscila Santos e Silva³

Bruna Santos⁴

Ledi Anghinoni⁵

Margot Alves Nunes Dode⁶

RESUMO

O objetivo do experimento foi avaliar o efeito de diferentes tempos de maturação ovocitária (18 e 24 horas) sobre a taxa de desenvolvimento e a proporção sexual dos embriões bovinos produzidos in vitro. Folículos de 2-8 mm foram puncionados de ovários bovinos coletados em abatedouros. A maturação ovocitária foi realizada em meio TCM 199 adicionado de FSH/LH e antibióticos, a 39°C e 5% de CO₂, durante 18 (G1) ou 24 horas (G2). O método de seleção dos espermatozoides utilizado foi o Gradiente de Percoll e o meio de fecundação foi o FERT-TALP. Decorridas 18-24h da fecundação, os zigotos foram transferidos para o cultivo em meio SOFaa, nas mesmas condições da maturação. No oitavo dia após a fecundação,

¹Médica Veterinária, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, ligia.pegoraro@cpact.embrapa.br

²Médica Veterinária, D.Sc., Professora Adjunta do Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, RS, mgrheing@yahoo.com.br

³Médica Veterinária, estagiária da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, priss_vet@ibest.com.br; brunalisan@yahoo.com.br

⁴Assistente da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, ledi.bitencourt@cpact.embrapa.br

⁵Médica Veterinária, PhD., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, margot.dode@cenargen.embrapa.br

foram comparados os índices de desenvolvimento embrionário nos dois grupos (% blastocistos de grau I e II/clivados).

Blastocistos de qualidade I e II foram destinados à sexagem pelo método de PCR (G1 n = 179; G2 n = 159). Para a determinação do sexo, os embriões foram agrupados segundo a velocidade de desenvolvimento em lentos (Bi e BI, G1 n = 42; G2 n = 37), intermediários (Bx; G1 n = 101; G2 n = 104) e rápidos (Bn e Be; G1 n = 36; G2 n = 18). A análise estatística do experimento, quanto ao desenvolvimento embrionário e proporção macho:fêmea entre os tratamentos e de cada tratamento com a teoricamente esperada de 1:1, foi realizada pelo teste do Qui-quadrado. Não houve diferença quanto ao desenvolvimento embrionário (G1 42,8% vs G2 42,2%) respectivamente para 24 e 48 horas de cultivo). Houve diferença da proporção sexual entre os tratamentos somente quando foram analisados os embriões de desenvolvimento rápido (50% vs 83,3% de machos no grupo 18 e 24 h respectivamente, $P < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre os grupos de desenvolvimento lento e intermediário, assim como entre a proporção total de machos de cada tratamento e a teoricamente esperada. A redução do tempo de maturação para 18 horas pode ser incorporada à rotina do processo de produção in vitro de embriões bovinos sem alterações dos índices de desenvolvimento e proporção de machos obtida.

Termos para indexação: proporção sexual; maturação in vitro; embriões bovinos

Maturation culture period, embryonic developmental rates and sex ratio of bovine in vitro produced embryos

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Maria Gabriela Tavares Rheingantz

Priscila Santos e Silva

Bruna Santos

Ledi Anghinoni

Margot Alves Nunes Dode

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different maturation culture times (18 and 24 hours) on development rate and sex ratio of bovine embryos produced in vitro. Ovaries were collected from cows at a local abattoir and brought to the laboratory in physiological saline solution containing antibiotics. The oocytes were aspirated from 2-8 mm follicle with an 18 gauge needle and syringe. The maturation culture of oocytes graded as I and II was performed in different time (G1 18 h and G2 24 h) in TCM 199 medium added with FH/LH and antibiotics at 39°C in a atmosphere of 5% CO₂. The sperm preparation method used was the Percoll density gradient (90 and 45%) and in vitro fertilization medium used was FERT-TALP. After the fertilization period, the zygotes were transferred to a culture dish containing 200 µl micro droplets of SOFaa medium under a layer of mineral oil at 39°C in an atmosphere of 5% CO₂. The development rate (% blastocyst I and II/cleaved) was compared among treatments at eight day after fertilization

At the same day of culture, blastocyst graded as I and II were harvested and the sex was examined by PCR reaction (G1 n = 179; G2 n = 159). According to their developmental stages, they were distributed in three groups: Slow (initial Blastocyst, Bi; Blastocyst, BI; G1 n = 42; G2 n = 37), Intermediate (expanding blastocyst, Bx; G1 n = 101; G2 n = 104) and Fast (hatched, Bh and hatching blastocyst, Be; G1 n = 36; G2 n = 18). A analysis was performed to compare development rates and sex ratios among different maturation time and each treatment from an expected ratio of 50:50. There was no difference between development rates (G1 42.8% vs G2 42.2%). There was difference between treatments only in the fast group (50% vs 83,3% of males in G1 and G2, respectively $P < 0.05$). There was no difference among slow and intermediate group, as well as total male proportion in each treatment and 50% expected sex ratio. The maturation time of 18 h may be incorporated in IVP bovine system without damage to development rates and sex ratio.

Index terms: maturation time, sex ratio, bovine embryos

INTRODUÇÃO

A produção in vitro de embriões (PIV) é uma importante tecnologia de reprodução assistida. Nos animais de interesse zootécnico a PIV é utilizada para multiplicação de raças/espécies de animais em perigo de extinção, otimização do potencial reprodutivo de fêmeas selecionadas e produção de embriões em grande escala para utilização em experimentos. Segundo o relatório anual da IETS, o Brasil ocupa papel de destaque na utilização desta tecnologia, sendo responsável por 66% da produção mundial (220.425 embriões bovinos produzidos in vitro; VIANA et al., 2010).

Entretanto, a PIV ainda apresenta algumas características limitantes como a baixa eficiência (LONERGAN; FAIR, 2008), a menor criotolerância dos embriões (FAIR et al. 2001) e a ocorrência do desvio na proporção sexual nos estágios de desenvolvimento mais adiantados em favor do sexo masculino (AVERY et al., 1991;1992; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1992; XU et al., 1992; YADAV et al., 1993; CARVALHO et al., 1996; TOCHARUS et al., 1997; PEGORARO et al., 1998; RHEINGANTZ et al., 2004). Estas características são consideradas entraves para sua maior inserção nos sistemas de produção e na utilização em raças leiteiras, que visa a obtenção de fêmeas.

Diferentes estudos foram conduzidos para avaliar a variação da proporção sexual dos embriões PIV. Entre estes, foram avaliadas as condições de cultivo (BREDBACKA; BREDBACKA, 1996; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 1996; PEGORARO et al., 1998;

RHEINGANTZ et al., 2004; KIMURA et al., 2005), o tempo de incubação ovócito/espermatozóide (KOCHHAR et al., 2003) e a influência do consumo de oxigênio no sexo dos embriões (AGUNG et al., 2005). Além disso, foi observada a maior sensibilidade dos embriões do sexo feminino à manipulações in vitro (KING et al., 1992; GUTIÉRREZ et al., 1993; CARVALHO et al., 1996). Outros fatores foram descritos, como a metodologia de separação de espermatozoides para a FIV (KANEKO et al., 1983; RHEINGANTZ et al., 2000), e também a participação do antígeno H-Y (AVERY et al., 1989), fatores de crescimento ligados ao cromossomo Y e a participação de diferentes mecanismos de expressão precoce de genes derivados de espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y (BURGOYNE, 1993; ZWINGMAN et al., 1993).

Experimentos realizados anteriormente sugerem a influência de diferentes tempos de maturação na proporção sexual de embriões bovinos após o cultivo in vitro (DOMINKO et al., 1997; GUTIÉRREZ-ADAN et al., 1999; PARK et al., 2005; AGUNG et al., 2006). No entanto, esses experimentos demonstraram resultados contraditórios, devido provavelmente ao pequeno número de embriões com sexo determinado.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de diferentes períodos de maturação ovocitária (18 e 24 horas) sobre a taxa de desenvolvimento embrionário e a proporção sexual dos embriões bovinos produzidos in vitro.

Material e Métodos

Ovários bovinos foram coletados de fêmeas abatidas em abatedouros da região e transportados até o laboratório, à temperatura de 32-35°C, em solução fisiológica adicionada de antibiótico (Gentamicina 0,5 mg/mL). No laboratório, os ovários foram lavados 4 vezes em solução fisiológica a temperatura de 32-35°C, e com o auxílio de agulha 18 G e seringa, foram puncionados os folículos de 2-8 mm. Após um período de decantação de 20 minutos do líquido folicular, foi realizada a busca e seleção dos ovócitos destinados à maturação. Foram selecionados somente ovócitos de qualidade I e II. Os reagentes utilizados no experimento foram obtidos na Sigma® (St Louis, MO, USA), com exceção dos indicados.

A maturação foi realizada em meio TCM 199 25mM Hepes (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) adicionado de 0,01UI/mL de rFSH (Gonal F-75 Serono, UK), 5 µg/mL de LH, 0,05 mg/ml de sulfato de estreptomicina, 0,065 mg/ml de penicilina G potássica e 0,25mg/ml de piruvato de sódio. Os ovócitos foram maturados em gotas de 200 µl sob óleo mineral, em placas de petri de 60 mm. Todos os cultivos foram realizados em estufa a 39°C, 5% de CO₂ em ar e atmosfera úmida. Foram realizados 2 grupos de maturação com distintos períodos: G1 = 18 horas e G2 = 24 horas.

O método de preparação dos espermatozoides utilizado foi o Gradiente de Percoll (90 e 45%; SAEKI et al., 1990). Os ovócitos da placa de maturação foram lavados em meio FERT-TALP (PARRISH et al., 1986), e então transferidos para a placa de fecundação após completar o tempo específico de cada tratamento (18 ou 24h). A fecundação foi realizada em meio

FERT-TALP adicionado de heparina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilamida (2mM), hipotaurina (1mM) e epinefrina (250mM), nas mesmas condições da maturação. A dose inseminante utilizada foi de 1×10^6 espermatozoides/ml. Durante o experimento foi utilizada uma única partida de um reprodutor de fertilidade comprovada.

Após o período da fecundação, os zigotos foram transferidos para as placas de cultivo. O cultivo embrionário foi efetuado em meio SOFaa (TAKAHASHI; FIRST, 1992) em gotas de 200 μl sob óleo mineral, em estufa a 39°C e 5% de CO_2 . O desenvolvimento embrionário foi avaliado nos dias 2 e 8 após a inseminação. No oitavo dia de cultivo (dia zero = dia da inseminação), foram observados os índices de desenvolvimento embrionário e os embriões de qualidade I e II foram destinados à sexagem pelo método de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para a sexagem, os embriões foram agrupados segundo a velocidade de desenvolvimento em lentos (blastocistos iniciais - Bi e blastocistos -BI), intermediários (blastocistos expandidos - Bx) e rápidos (blastocistos em eclosão - Bn e blastocistos eclodidos - Be). Após a retirada da zona pelúcida, os embriões foram lavados em PBS e colocados em tampão de lise (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K, Gibco, BRL, 15mM Tris HCl pH 8,9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 e 0,1% Triton x-100), sendo então incubados a 37°C por 60 min e a 95°C por 15 min para a inativação da proteinase K. Em seguida, os tubos com embriões lisados foram armazenados a -20°C até o momento da sexagem. Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio, e analisados sob luz ultravioleta. As amostras que apresentaram apenas um produto com 216 pb foram consideradas do sexo feminino e aquelas que apresentaram um produto com 175 pb, específico

do cromossomo Y, além do produto com 216 pb, foram consideradas do sexo masculino.

Resultados e Discussão

Foram realizadas 10 repetições durante o experimento. Em todas as repetições não foi detectado efeito significativo dos distintos períodos de maturação (18 e 24 horas) sobre as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de rendimento global da produção in vitro de embriões bovinos (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de rendimento global entre distintos períodos de maturação (18 e 24h) na produção in vitro de embriões bovinos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2010.

Período de maturação	Taxa de clivagem (%)	Desenvolvimento embrionário blastocistos/clivados em D-8 (%)	Rendimento global blastocistos/ovócitos inseminados em D-8 (%)
18 h	413/845 (48,87%)	179/413 (43,3%)	179/845 (21,1%)
24 h	436/830 (52,53%)	184/436 (42,2%)	184/830 (22,2%)
Total	849/1675 (50,68%)	363/849 (42,7%)	363/1675 (21,6%)

P > 0,05

Outros experimentos que avaliaram diferentes tempos de maturação sobre o desenvolvimento embrionário apresentaram resultados divergentes. Os estudos iniciais efetuados por Gutiérrez-Adán et al. (1996, 1999) e Dominko e First (1997) avaliando 2 períodos (16 e 24hs) demonstraram que as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram superiores quando a inseminação foi realizada mais tardiamente (24hs). Em outro estudo, Park et al. (2005) avaliando a influência de 16, 18, 20, 22 e 24 hs de maturação observaram semelhantes taxas de clivagem. Contrariamente a nosso experimento, as taxas de desenvolvimento de embriões de 8 células e blastocistos produzidos com 18 h de maturação foram superiores a todos outros períodos. Estes embriões também apresentaram maior potencial de desenvolvimento *in vivo* com maior taxa de prenhez após transferência para receptoras e sem a incidência da síndrome do “terneiro grande”. Os autores atribuem os resultados a causas ainda desconhecidas e a possível fator maléfico relacionado ao envelhecimento dos ovócitos durante o processo de maturação *in vitro*. Por outro lado, Agung et al. (2006) em outro estudo avaliando 16, 22, 28 e 34 hs de maturação observaram taxas de clivagem e de blastocistos superiores no grupo com 22 hs de maturação aos demais grupos testados .

O efeito de diferentes períodos de maturação sobre a proporção sexual somente foi significativo quando foram analisados os embriões de desenvolvimento rápido (50% versus 83,3% de machos no grupo 18 e 24 h respectivamente, $P < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre os grupos de desenvolvimento lento e intermediário, assim como entre a proporção total de machos de cada tratamento e a teoricamente esperada (Tabela

2). Estes resultados correspondem aos estudos iniciais efetuados por Silva et al. (1990) no mesmo laboratório.

Tabela 2. Proporção sexual dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (Dia 8) após diferentes períodos de maturação ovocitária (18 e 24 h). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2010.

Estágio de desenvolvimento	Proporção macho:fêmea (% machos)	
	Grupo 18 h	Grupo 24 h
Lentos (Bi + Bl)	22:20 (52,3) ^a	17:20 (45,9) ^a
Intermediários (Bx)	49:52 (48,5) ^a	48:56 (46,1) ^a
Rápidos (Bn + Be)	18:18 (50,0) ^a	15:03 (83,3) ^b
Total	89:90 (49,7) ^a	80:79 (50,3) ^a

Na linha, letras desiguais diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

O efeito do período de maturação ovocitária sobre a proporção sexual dos embriões bovinos produzidos *in vitro* foi observado por outros autores. Os experimentos de Gutiérrez-Adan et al. (1996; 1999), Dominko e First (1997) e Agung et al. (2005) demonstraram que quando o período de maturação foi mais longo, havia a geração de um número maior de machos. Neste experimento, este desvio foi observado exclusivamente entre os embriões do grupo de desenvolvimento rápido. Tem sido sugerido que a inseminação mais tardia de ovócitos maturados *in vitro* pode permitir que ovócitos bloqueados em estágio de MII desenvolvam mecanismos que facilitem o processamento mais efetivo de espermatozóides carreadores do cromossomo Y e seus componentes regulatórios associados (DOMINKO; FIRST, 1997). Da mesma forma, é cogitado que existam diferenças intrínsecas na atividade fisiológica (motilidade/viabilidade)

(PENFOLD et al., 1998) ou a capacitação/reação do acrossoma dos espermatozoides carreadores dos cromossomos X e Y antes da fecundação (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1999).

No entanto, Park et al (2005) verificaram o contrário, um maior número de produtos de sexo masculino quando o período de maturação foi de 18 h, quando comparado com 24 h (7/7 versus 4/3). Estes dados devem ser analisados com mais rigor devido ao pequeno número de observações.

CONCLUSÕES

Os diferentes tempos de maturação ovocitária (ou o estágio de maturação ovocitária) testados de 18 e 24 horas:

- não afetaram a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário dos embriões bovinos produzidos *in vitro*;
- não foram determinantes da variação da proporção sexual total dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. A proporção sexual somente foi alterada entre os embriões de desenvolvimento rápido, quando houve uma maior geração de embriões de sexo masculino no grupo de maturação de 24 h.

A redução do tempo de maturação para 18 horas pode ser incorporada à rotina do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos sem alterações dos índices de desenvolvimento e proporção de machos obtida.

REFERÊNCIAS

AGUNG, B.; OTOI, T.; ABE, H.; HOSHI, H.; MURAKAMI, M.; KARJA, N. W. K.; MURAKAMI, M. K.; WONGSRIKEAO, P.; WATARI, H.; SUZUKI, T. Relationship between oxygen consumption and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Linköping, v. 40, n. 1, p. 51-56, 2005.

AGUNG, B.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, R.; WATARI, H.; NAGAI, T. Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 123-127, 2006.

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

AVERY, B.; MADISON, V.; GREVE, T. Sex and development in bovine *in-vitro* fertilized embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 35, p. 953-963, 1991.

AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Sweden, v. 30, 147-153, 1989.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 106, p. 169-172, 1996.

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

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

DOMINKO, T.; FIRST, N. L.: Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 47, p. 1041-1050, 1997.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYÉS, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction Development**, Stanford, v. 58, p. 186-195, 2001.

GUTIERREZ, A.; PINTADO, B.; FUENTES, S.; PAYAS, A.; UGARTE, C.; DE LA FUENTE, J. Influence of micromanipulation and *in vitro* culture in the sex dependent loss of embryos. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPE ASSOCIATION AETE, 9., 1993, Lyon. **Proceedings...** Lyon: 1993. p.206.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; PEREZ, G.; GRANADOS, J.; GARDE, J. J.; PEREZ-GUZMÁN, M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Theriogenology**, Gainesville, v. 51, n. 1, p. 397, 1999.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; MEDRANO, J. F.; MURRAY, J. D. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. **Theriogenology**, Gainesville, v. 46, n. 3, p. 515-525, 1996.

KANEKO, S.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, T.; IIZUKA, R. Separation of human X- and Y- bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertility & Sterility**, Birmingham, v. 40, n. 8, p. 661-665, 1983.

KIMURA, K.; SPATE, L. D.; GREEN, M. P.; ROBERTS, R. M. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. **Molecular Reproduction Development**, Stanford, v. 72, p. 201-207, 2005.

KING, W. A; PICARD, L.; BOUSQUET, D.; GOFF, A. K. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 96, p. 453-459, 1992.

KOCHHAR, H. S.; KOCHHAR, K. P.; BASKUR, P. K.; KING, A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Sciences**, Savoy, v. 77, p. 33-49, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, Gainesville, v. 69, p. 17-22, 2008.

MARQUANT LE GUIENNE, B.; NIBART, M.; GUYADER, C.; KOHEN, G.; ESPOSITO, L.; THUARD, J. M.; THIBIER, M. DNA probe sexing of young *in vitro* fertilized bovine embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 37, p. 253, 1992.

PARK, Y. S.; KIM, S. S.; KIM, J. M.; PARK, H. D.; BYUN, M. D. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 64, p. 123-134, 2005.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Gainesville, v. 25, p. 591-600, 1986.

PEGORARO, L. M. C.; THUARD, J. M.; DELALLEAU, N.; GUÉRIN, B.; DESCHAMPS, J. C.; MARQUANT LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. I. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or Vero cells. **Theriogenology**, Gainesville, v. 49, p. 1579-1590, 1998.

PENFOLD, L. M.; HOLT, C.; HOLT, W. V.; WELCH, G. R. CRAN, D.G.; JOHNSON, L. A. Comparative motility of X and Y chromosome-bearing sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. **Molecular Reproduction and Development**, Stanford, v. 50, p. 32-37, 1998.

RHEINGANTZ, M. G. T.; PEGORARO, L. M. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; PIMENTEL, A. M.; BERNARDI, M. L.; DESCHAMPS, J. C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozóides selecionados por *Swim-up* ou Gradiente de Percoll. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 411, 2004.

RHEINGANTZ, M. G. T; PEGORARO, L. M. C; DESCHAMPS, J. C.; BERNARDI, M. L.; PIMENTEL, A. Effect of sperm preparation method on sex ratio from bovine produced embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000.

SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED-RUTHLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. **Theriogenology**, Gainesville, p. 34, p. 1035-1039, 1990.

SILVA, P. S.; SANTOS, B.; RHEINGANTZ, M. G. T.; DODE, M. A.; ANGHINONI, L.; PEGORARO, L. M. C. Efeito do estágio de maturação ovocitária sobre a proporção sexual dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2006, Gramado. **Anais...** Gramado, 2006. 1 CD-ROM.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, maino acids and vitamins. **Theriogenology**, Gainesville , v. 37, p. 963-978, 1992.

TOCHARUS, C.; SUKBUNTEUNG, J.; JARAUANSUWAN, M.; CHUANGSOONGNEON, U.; KITIYANANT, Y.; PAVASUTHIPAISIT, K. Different developmental stages of bovine embryos produced *in vitro*: their sex ratio and survival rates. **Theriogenology**, Gainesville, v. 47, n. 1, p. 330, 1997.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, supl. 3, p. 661- 674, 2010.

XU, K. P.; YADAV, B. R.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, Stanford, v. 31, p. 249-252, 1992.

YADAV, B. R.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Relationships between the completion of the first cleavage and the chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, Stanford, v. 36, p. 434-439, 1993.

ZWINGMAN, T.; ERICKSON, R. P.; BOYE, T.; AO, O. Transcription of the sex determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Stanford, v. 90, n. 3, p. 814-817, 1993.

