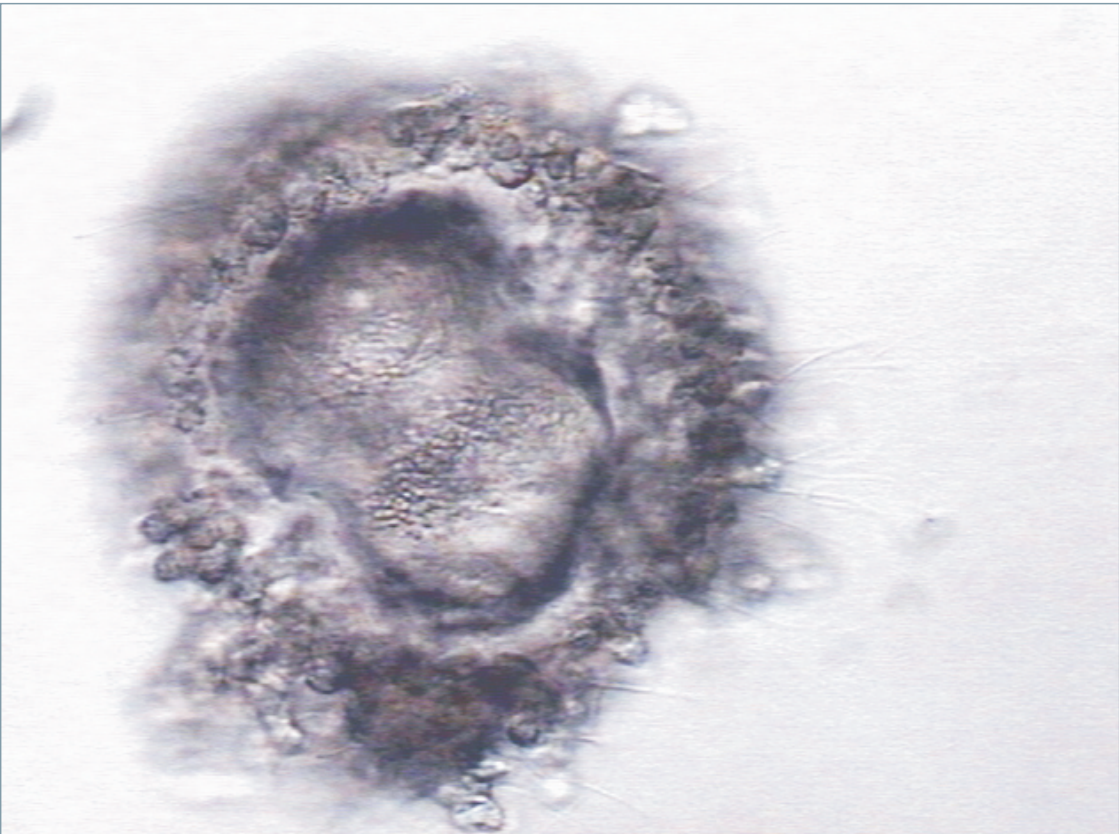


Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento **40**

ISSN 1981-2078
Maio, 2017

Alternativas para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*



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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40

Alternativas para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Simone Cristina Méo Niciura
Paula Macieira e Guimarães
Caroline de Moraes Ferracioli
Giovanna Gabrielle Cruvinel
Waldomiro Barioni Júnior

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
13560 970, São Carlos, SP
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3411- 5600
Home page: www.embrapa.br/pecuaria-sudeste

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Berndt
Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura
Membros: Emília Maria Pulcinelli Camarnado, Mara Angélica Pedrochi, Maria Cristina Campanelli Brito, Milena Ambrosio Telles

Normalização bibliográfica: Maria de Fatima da Cunha - Embrapa
Informação Tecnológica
Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito
Foto(s) da capa: Simone Cristina Méo Niciura

1ª edição

1ª edição on-line (2017)

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Alternativas para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*/ Simone Cristina Méo Niciura [et al.] — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2017.

37p. il. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /Embrapa Pecuária Sudeste, ISSN 1981-2078; 40).

1. Bovino. 2. Embrião. 3. Melhoramento genético animal. 4. Metabolismo embrionário. I. Niciura, Simone Cristina Méo. II. Guimarães, Paula Macieira e. III. Ferracioli, Caroline de Moraes. IV. Cruvinel, Giovanna Gabrielle. V. Barioni Júnior, Waldomiro. VI. Título. VII. Série.

CDD: 636.08926

© Embrapa 2017

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Metodologia	10
Resultados e discussão.....	14
Conclusões.....	31
Referências	32

Alternativas para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*

*Simone Cristina Méo Niciura*¹

*Paula Macieira e Guimarães*²

*Caroline de Moraes Ferracioli*³

*Giovanna Gabrielle Cruvinel*⁴

*Waldomiro Barioni Júnior*¹

Resumo

A produção *in vitro* de embriões contribui para o melhoramento genético e para a produção animal, e mais benefícios podem ser alcançados com a determinação precoce e não-invasiva da viabilidade e do sexo dos embriões. Com o objetivo de explorar o dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, foram avaliados os efeitos da velocidade de desenvolvimento e das alterações na concentração de glicose, DNP, atmosfera de oxigênio, coloração com BCB e expressão do gene *G6PD* durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. A proporção do sexo, determinada por PCR, não foi afetada pela velocidade de desenvolvimento, adição de DNP ou atmosfera de oxigênio; enquanto o cultivo com 5,6 mM de glicose a partir do dia 5 (D5) aumentou a proporção de fêmeas nos blastocistos no D7. A redução na atmosfera para 5% de O₂ aumentou as taxas de blastocisto, e a intensa coloração azul dos embriões expostos ao BCB no D4 identificou os embriões de maior viabilidade. Embriões machos e fêmeas de duas células e oito células apresentaram padrão diferencial de expressão do gene *G6PD*. Assim, concluímos que alterações no sistema de cultivo afetam as taxas de desenvolvimento embrionário e permitem identificar a viabilidade e alterar a proporção dos sexos em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Termos para indexação: velocidade de desenvolvimento; metabolismo embrionário; coloração com BCB; expressão de *G6PD*

¹ Pesquisadores da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, simone.niciura@embrapa.br; waldomiro.barioni@embrapa.br

² Biotecnologista, pmeg500@gmail.com

³ Graduada em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, carolineferracioli@yahoo.com.br

⁴ Graduada em Medicina Veterinária no Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, SP, giovanna.g.cruvinel@gmail.com

Alternatives for sexing *in vitro* produced bovine embryos

Abstract

In vitro embryo production contributes to genetic improvement and production in livestock, and more benefits can be achieved with the early and non-invasive determination of sex and viability of embryos. Aiming to explore the sexual dimorphism between males and females, it was evaluated the effects of developmental kinetics and changes in glucose and DNP concentration, oxygen atmosphere, BCB staining and *G6PD* gene expression during *in vitro* culture of bovine embryos. The sex ratio, determined by PCR, was not affected by developmental kinetics, supplementation with DNP or oxygen atmosphere; while culture with 5.6 mM glucose from day 5 (D5) increased female ratio in D7 blastocysts. The atmosphere reduction to 5% O₂ increased blastocyst rates, and intense blue staining of the embryos exposed to BCB on D4 was associated with higher viability. Male and female two-cell and eight-cell stage embryos presented differential expression patterns for the *G6PD* gene. Thus, we conclude that changes in culture system affect embryonic development rates and can be used to identify embryo viability and to affect sex ratio in *in vitro* produced bovine embryos.

Key words: developmental kinetics; embryonic metabolism; BCB staining; *G6PD* gene expression

Introdução

O uso da fecundação *in vitro* em programas de reprodução de bovinos tem crescido nas últimas décadas. Segundo dados da International Embryo Technology Society (IETS), foram transferidos 30.569 embriões em 1997 (PERRY, 2013) e 364.662 em 2014 (PERRY, 2015), e o Brasil apresenta as maiores taxas de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) no mundo (VIANA et al., 2010), com 70,8% do total mundial (PERRY, 2014).

Na PIV, a determinação da viabilidade dos embriões, ou seja, o potencial em estabelecer e manter com sucesso a prenhez após a transferência (LOPES et al., 2007), reduz os custos e otimiza a utilização das fêmeas receptoras. Para a identificação e a seleção de oócitos e embriões viáveis, podem ser usados critérios como morfologia, diâmetro, consumo de oxigênio e de glicose, conteúdo de glicose-6-fosfato desidrogenase (*G6PD*) e de glutatona (AGUNG et al., 2005; ALM et al., 2005; LOPES et al., 2007; GARCIA-HERREROS et al., 2012; WANG et al., 2016).

Além da viabilidade, é crescente o interesse pela determinação precoce do sexo do embrião, o que traz benefícios à produção e ao melhoramento genético animal (JOHNSON, 2000; MAXWELL et al., 2004), e, quanto mais precoce a sexagem, mais desejáveis são seus efeitos. Apesar de a sexagem de espermatozoides ser a técnica mais precoce de determinação do sexo a partir do gameta masculino, a separação de espermatozoides por citometria de fluxo requer equipamentos sofisticados, possui baixa velocidade de processamento e pode resultar em danos ao DNA (JOHNSON, 2000; MAXWELL et al., 2004). Assim, a sexagem de embriões torna-se uma alternativa viável de determinação precoce do sexo. Entretanto, quando realizada de maneira convencional, requer a biópsia do embrião, é demorada e invasiva, o que inviabiliza a comercialização dos embriões sexados em razão da perda da integridade da zona pelúcida (MAPLETOFT; HASLER,

2005). Por esses motivos, para que se torne amplamente utilizado na PIV, é necessário o desenvolvimento de um método de sexagem não-invasivo, simples, pouco oneroso e em larga escala.

Uma maneira de se fazer a sexagem de maneira não-invasiva é explorar o dimorfismo sexual existente entre os embriões machos e fêmeas nos estádios iniciais do desenvolvimento. Sabe-se que o desenvolvimento e o metabolismo são mais rápidos em embriões machos (ALOMAR et al., 2008) e que há maior expressão de genes do cromossomo X em fêmeas antes da inativação de um dos cromossomos X (DE LA FUENTE et al., 1999), nos estádios embrionários entre a fecundação e o desenvolvimento até blastocisto.

Em relação ao metabolismo, a glicose é um importante substrato energético para o embrião e, após entrar nas células embrionárias, a glicose pode seguir as cascatas glicolítica, de fosforilação oxidativa ou das pentoses fosfato (PPP) (RIEGER, 1992; GARCIA-HERREROS et al., 2012). Esse processo também é influenciado pelo sexo dos embriões, visto que o metabolismo total de glicose é duas vezes maior em machos enquanto a atividade da PPP é quatro vezes maior em fêmeas (TIFFIN et al., 1991). Assim, o controle ou o favorecimento de uma das cascatas metabólicas, por exemplo, por meio da inibição da fosforilação oxidativa e do favorecimento da glicólise (HARVEY et al., 2004) pelo 2,4-dinitrofenol (DNP), ou pela redução da concentração de O_2 durante o cultivo *in vitro* (THOMPSON et al., 2000; GREEN et al., 2016), pode promover desvios na proporção dos sexos ou afetar o desenvolvimento embrionário.

Em relação à atmosfera de oxigênio, além de afetar o metabolismo, a tensão de O_2 durante o cultivo, em geral a 5% de CO_2 em ar ($\sim 20\%$ de O_2), é superior à encontrada pelo embrião no trato genital feminino, o que pode alterar o estado redox celular, levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e prejudicar o desenvolvimento (HARVEY et al., 2004; RHO et al., 2007).

Dentre os genes específicos do cromossomo X, destaca-se aquele que codifica a enzima *G6PD*, que participa da via PPP, fornece ribose-fosfato para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos (BHOJWANI et al., 2007) e atua como agente anti-oxidante (PÉREZ-CRESPO et al., 2005). A atividade da *G6PD* pode ser mensurada indiretamente pela coloração com brilliant cresyl blue (BCB), pois a *G6PD* reduz o corante vital azul BCB em um composto sem cor (WILLIAMS, 1986), de maneira que quanto menor for a atividade da *G6PD* maior será a coloração azul do oócito ou do embrião (ALM et al., 2005).

Assim, este trabalho explora o dimorfismo existente entre embriões machos e fêmeas como ferramenta para o desenvolvimento de uma metodologia não-invasiva para a sexagem e para a determinação da viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem prejuízos às taxas de desenvolvimento. Para tanto, foram avaliados os efeitos da velocidade de desenvolvimento (de oito células a blastocisto expandido), das modificações nas condições de cultivo *in vitro* (adição de glicose e de DNP, alteração na atmosfera de O₂ e coloração com BCB) sobre as taxas de desenvolvimento e a proporção de embriões machos e fêmeas, assim como a expressão diferencial do gene *G6PD* entre os embriões dos dois sexos.

Metodologia

Ovários de fêmeas bovinas foram coletados em frigoríficos comerciais e transportados em solução fisiológica a 28-30°C ao laboratório da Embrapa Pecuária Sudeste, em, no máximo, quatro horas.

Foram utilizados reagentes Sigma, exceto quando mencionado. Os procedimentos de incubação *in vitro* foram realizados em microgotas de 100 µL de meio de cultivo, acrescido de 0,2 mM de piruvato de sódio (P4562) e 75 µg/mL de sulfato de kanamicina (K1637), cobertas com óleo mineral (M3516), à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (~ 20% de O₂).

Folículos de 3 a 7 mm de diâmetro foram aspirados dos ovários, e o fluido folicular foi decantado para a separação dos oócitos. Oócitos de cumulus compacto com pelo menos quatro camadas de células foram destinados à maturação *in vitro* (MIV) em TCM 199 (M5017) com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cripion), 1,0 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Folltropin-V, Bioniche), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorulon, Intervet) e 1,0 µg/mL de estradiol (E2758), durante 24 h.

A seguir, os oócitos maturados foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) com sêmen separado em mini gradiente (45% e 90%) de Percoll (P4937) e na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL em meio TALP-FIV. Nos experimentos, foi alternado uso do sêmen de dois touros. O meio TALP foi acrescido de 30 µg/mL de heparina (H3149), 18 µM de penicilamina (P4875), 10 µM de hipotaurina (H1384), 1,8 µM de epinefrina (E4250) e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; A6003) por 20-22h.

Após a FIV, os embriões foram destinados ao cultivo *in vitro* (CIV) em SOF, sem glicose e com 0,2 mM de L-glutamina (G3126), 0,34 mM de tri-citrato de sódio (S4641), 2,8 mM de myo-inositol (I7508), 2,5% de SFB e 3 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos (A8806). O cultivo foi realizado durante oito dias, e a cada 48h foi realizado o feeding, ou seja, a substituição de 50% do meio de desenvolvimento por SOF recém-preparado, e foram recuperados, pelo menos, 30 embriões em cada tratamento, exceto para os blastocistos no D6.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado sob microscópio estereoscópico quanto às taxas de clivagem (48h após a inseminação – hpi; Dia 2 – D2) e de desenvolvimento até quatro células (D2), oito células (D3), dezesseis células (D4), trinta e duas células (D5), mórula (D6), blastocisto (D7) e blastocisto expandido (D8). Os embriões foram submetidos à remoção das células do cumulus por pipetagem em 0,5% de hialuronidase (Hial20, Biometila) e à retirada da zona pelúcida por incubação em solução Tyrodes ácida (pH 2,2). A seguir,

foram coletados em 1 μL de água tratada com DEPC (D5758) em microtubos de 0,2 mL, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C .

A confirmação do sexo foi feita por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Para a sexagem, os embriões foram incubados a 95°C por 10 min, e 1/3 do lisado (0,3 μL) de cada embrião foi utilizado diretamente na reação de PCR para amplificação simultânea de fragmento de 300 bp do cromossomo Y e de 538 bp de sequência autossômica do genoma bovino (RATTANASUK et al., 2011). A reação de PCR, em volume final de 20 μL , consistiu de 1X de tampão, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP (Ludwig Biotec), 1 U de Taq DNA polimerase (10966-030, Invitrogen), 0,25 μM de cada primer para cromossomo Y (BYfor: 5'-CTCAGCAAAGCACACCAGAC-3' e BYrev: 5'-GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC-3'), 0,1 μM de cada primer para sequência autossômica (BSPfor: 5'-TTTACCTTAGAACAACCGAGGCAC-3' e BSPrev: 5'-TACGGAAAGGAAAGATGACCTGACC-3') e 0,3 μL de DNA. Em todas as reações, além das amostras, foi utilizado um controle positivo para fêmea, um controle positivo para macho e um controle negativo (sem DNA). Foram realizados 45 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 60°C por 45s e extensão a 72°C por 50s. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de 1,5% de agarose (16500-100, Invitrogen) corado com 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo (Ludwig) e, após comparação com o ladder de 100 bp (Ludwig), a amplificação de duas bandas (538 e 300 bp) identificou o embrião como macho e de uma banda (538 bp), como fêmea.

As alterações nas condições de cultivo visando a promover a sexagem dos embriões consistiram de:

- i) Adição de 0, 1,5, 5,6 ou 10 mM de glicose (G3126) ao meio SOF do D5 ao D8;
- II) Adição de 0, 5, 10 ou 30 μM de DNP (D198501) ao meio SOF do D5 ao D8;

- III) Alteração da atmosfera de oxigênio para 5% de O₂ (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂) a partir do D1;
- IV) Coloração com 26 μM de brilliant cresyl blue (BCB; B5388) em meio SOF por 90 min de todos os embriões no D4 e classificação em três categorias: coloração azul forte (BCB+), coloração azul fraca (Intermediários) e ausência de cor (BCB-). Após a coloração, os embriões foram mantidos no cultivo em SOF até o estágio de blastocisto (D7 e D8).

As taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto e as proporções dos sexos nos embriões foram comparadas por meio de análise estatística pelo teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher, ao nível de significância de 5%.

A avaliação da expressão gênica foi realizada nos embriões de duas, quatro, oito, dezesseis, trinta e duas células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido por qPCR no ABI Prism® SDS 7500 (Applied Biosystems). Para tanto, 2/3 do lisado de embriões (0,6 μL) foram submetidos à transcrição reversa com o kit Superscript III (18080-400, Invitrogen). Na qPCR, em duplicata, foi utilizado cDNA equivalente a 0,1 (2 μL) ou 0,15 (3 μL) embrião em reação de 20 μL com SYBR Green PCR Master Mix (4309155, Applied Biosystems). Após teste de concentração dos primers, foram avaliados os genes de referência:

- i) *GADPH* - GI 402744670, éxons 6 e 7; 300 nM de 5'-GCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' e 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'; fragmento de 118 bp;
- II) β-actina - GI: 22655315, éxon 3; 600 nM de 5'-GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA-3' e 300 nM de 5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'; 78 bp;
- III) *RPS-9* - GI: 402743974, éxons 3 e 4; 600 nM de 5'-GTGAGGTCTGGAGGGTCAA-3' e de 5'-GGGCATTACCTTGAACAG-3'; 108 bp.

A ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) foi utilizada para a seleção do melhor gene de referência para normalização dos dados. Para a avaliação da expressão do gene alvo, ligado ao cromossomo X, glucose 6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*; GI: 119919950, éxons 9 e 10) foram utilizados 600 nM dos primers 5'-GCCGTCCTCTATGTGGAAAATGA-3' e 5'-CGCAGCGCAGGATGAAG-3' e realizada a amplificação de fragmento de 58 bp (OLIVEIRA et al., 2013). As curvas de amplificação geradas foram usadas para o cálculo das eficiências de reação pelo LinReg (RAMAKERS et al., 2003), e a mensuração das diferenças significativas ($P < 0,05$) foi feita pelo Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test no Relative Expression Software Tool (PFAFFL et al., 2002).

Resultados e Discussão

Sexagem por PCR:

Para os diferentes experimentos, foi possível determinar o sexo por PCR multiplex (Figura 1) em 75% a 93,3% dos embriões coletados. Uma vez que foi usado somente 1/3 de embrião na reação e que esta foi feita com embriões desde o estágio de duas células (no qual há menor quantidade de DNA), considera-se que a taxa de sucesso para a determinação do sexo foi satisfatória.

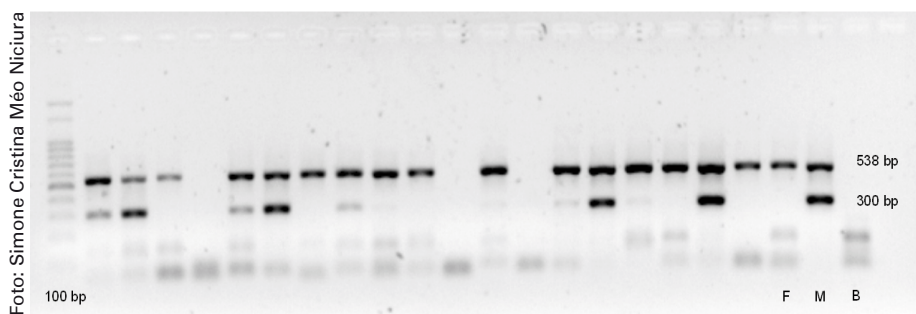


Figura 1. Gel de agarose corado com brometo de etídeo após eletroforese de produto de PCR multiplex para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Machos (M): bandas de 538 e 300 bp. Fêmeas (F): banda de 538 bp. B: branco.

Para os experimentos de velocidade de desenvolvimento e expressão gênica, os embriões foram coletados nos estádios de duas células a blastocisto expandido e destinados à sexagem (Figura 2). Houve predomínio, em número, de embriões fêmeas para todos os estádios do desenvolvimento, exceto em blastocisto expandido (Figura 2). Assim, para o total de embriões coletados ($n = 225$), foi observado que o sistema de cultivo *in vitro* utilizado levou à maior ($P < 0,05$) proporção de fêmeas (67,1%) em comparação à quantidade de machos (32,8%). Esses resultados devem-se, principalmente, ao desvio ($P < 0,05$) para fêmeas, em relação à proporção esperada de 1:1, observado nos estádios de quatro células, oito células e trinta e duas células (Figura 2).

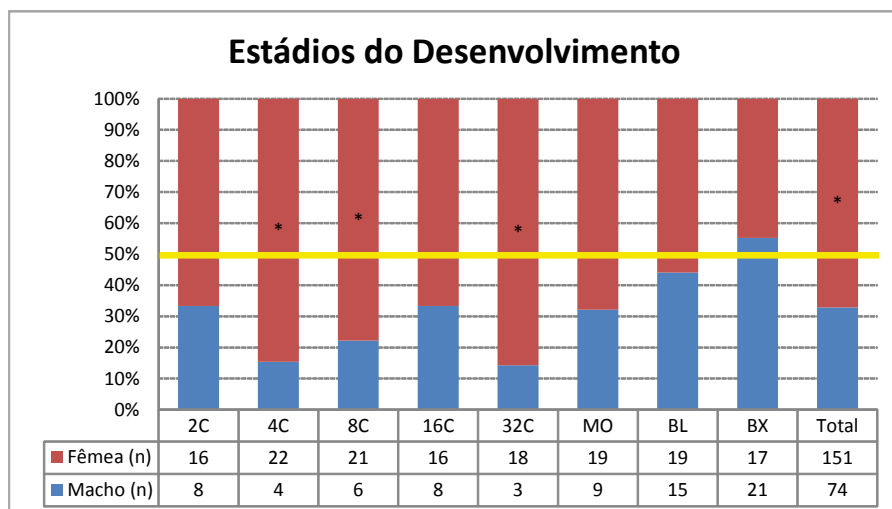


Figura 2. Número (n) e proporção dos sexos (%) nos embriões coletados nos estádios de duas células (2C), quatro células (4C), oito células (8C), dezesseis células (16C), trinta e duas células (32C), mórula (MO), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e total.

* $P < 0,05$.

Esses resultados, com maior desvio do sexo para fêmeas, são contrários aos da literatura, que reportam desvios maiores para machos nos sistemas de PIV de embriões bovinos (LONERGAN et al., 1999; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; PEIPPO et al., 2002; WRENZYCKI et al., 2002). Essas diferenças podem ser decorrentes dos sistemas

de cultivo utilizados, com influência do meio, do soro (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001) e do touro (ALOMAR et al., 2008). Além disso, podem refletir os estádios em que os embriões foram sexados, pois na literatura foram avaliados embriões em mórula ou blastocisto, estádios para os quais não observamos desvios na proporção dos sexos. Desvios nos sexos entre estádios já foram reportados como presentes em blastocistos, mas ausentes em mórulas (WRENZYCKI et al., 2002).

Os maiores desvios foram observados em estádios mais precoces do desenvolvimento (quatro células, oito células e trinta e duas células) e não foram detectados em estádios mais adiantados (mórula, blastocisto e blastocisto expandido). Assim, esses achados podem refletir a inibição seletiva de embriões fêmeas em alguma fase do desenvolvimento (KIMURA et al., 2008) ou a ocorrência de embriões partenogênicos (BREDBACKA; BREDBACKA, 1996; PEIPPO et al., 2001), que são sexados como fêmeas, mas que possuem menor potencial de desenvolvimento até os estádios mais adiantados, principalmente quando haploides (LAGUTINA et al., 2004).

Velocidade de desenvolvimento:

Com o objetivo de verificar se a velocidade com que o embrião se desenvolve é influenciada pelo sexo, foram avaliados os embriões que atingiram os estádios de oito células a blastocisto expandido um dia antes do esperado (desenvolvimento rápido) ou no dia esperado para aquele determinado estágio (desenvolvimento normal) (Figura 3). Não foram detectadas diferenças ($P > 0,05$) na velocidade (rápido e normal) de desenvolvimento entre embriões machos e fêmeas em nenhum dos estádios do desenvolvimento (Figura 3).

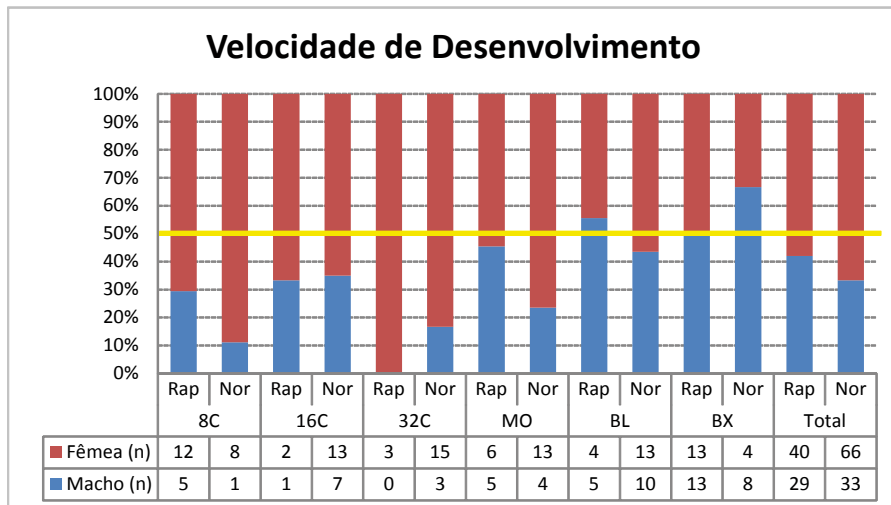


Figura 3. Número (n) e proporção dos sexos (%) em embriões com diferentes velocidades de desenvolvimento: rápido (Rap) ou normal (Nor), nos estádios de oito células (8C), dezesseis células (16C), trinta e duas células (32C), mórula (MO), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e total.

Em adição, somente para os blastocistos, foi avaliada a velocidade de desenvolvimento rápida (D6), normal (D7) e lenta (D8; desenvolvimento um dia após o esperado) (Figura 4), e também não foi detectada alteração ($P > 0,05$) na proporção dos sexos.

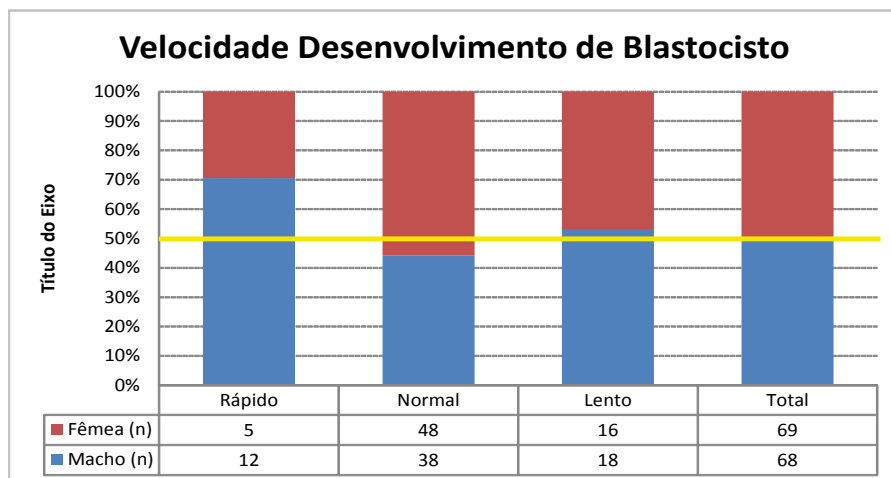


Figura 4. Número (n) e proporção dos sexos (%) em blastocistos com diferentes velocidades de desenvolvimento: rápido (Dia 6), normal (Dia 7) e lento (Dia 8).

Na literatura, há relatos de que embriões machos desenvolvem-se mais rapidamente do que fêmeas (PEIPPO et al., 2001; ALOMAR et al., 2008; RUBESSA et al., 2011), enquanto outros estudos não reportam diferenças entre os sexos na velocidade de desenvolvimento (HOLM et al., 1998; LONERGAN et al., 1999). Assim, nas condições experimentais aqui descritas, a velocidade de desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, nos diferentes estádios, não foi influenciada pelo sexo.

Alteração na concentração de glicose:

Visando a alterar o metabolismo energético dos embriões, foi avaliado o efeito da adição de glicose em quatro concentrações no meio CIV a partir do D5 sobre as taxas de desenvolvimento (Tabela 1) e as proporções dos sexos (Figura 5). No meio SOF, não houve a adição de glicose, e as fontes energéticas utilizadas foram: piruvato (0,2 mM), lactato (5,35 μ M), glutamina (0,2 mM), tri-citrato de sódio (0,34 mM) e myo-inositol (2,8 mM). Entretanto, como o meio SOF foi suplementado

com 2,5% de SFB e considerando que o soro possui 5,6 mM de glicose (KIMURA et al., 2008), assume-se que o cultivo sem adição de glicose foi feito, na realidade, com cerca de 0,14 mM de glicose.

A adição de até 10 mM de glicose ao meio não afetou ($P > 0,05$) as taxas de desenvolvimento até blastocisto (Tabela 1). Essa observação é contrária ao relato de que a adição de glicose é prejudicial às taxas de desenvolvimento (RUBESSA et al., 2011), enquanto outros estudos mostram efeitos benéficos da adição de 5,6 mM de glicose sobre as taxas de desenvolvimento, a partir de 120 hpi, para bovinos (KIM et al., 1993), ou de seu uso em concentrações constantes durante a produção *in vitro* de embriões bubalinos (KUMAR et al., 2013).

Tabela 1. Clivagem e desenvolvimento até blastocisto nos Dias 6, 7 e 8 e total, em embriões bovinos produzidos *in vitro*, após adição de 0, 1,5, 5,6 ou 10 mM de glicose a partir do D5.

Glicose	Clivagem	Blastocisto			
		Dia 6	Dia 7	Dia 8	Total
0 mM	159/300 ^b	6/300	22/300	17/300	45/300
	(53,0%)	(2,0%)	(7,3%)	(5,7%)	(15,0%)
1,5 mM	153/298 ^b	11/298	15/298	18/298	44/298
	(51,3%)	(3,7%)	(5,0%)	(6,0%)	(14,8%)
5,6 mM	192/312 ^a	10/222	14/222	13/222	37/222
	(61,5%)	(4,5%)	(6,3%)	(5,9%)	(16,7%)
10 mM	173/300 ^{a,b}	5/300	17/300	12/300	34/300
	(57,7%)	(1,7%)	(5,7%)	(4,0%)	(11,3%)
P valor	P = 0,0473	P = 0,1548	P = 0,6804	P = 0,6754	P = 0,3415

^{a,b}Valores com sobrescritos diferentes, diferem ao nível de significância de 5%.

A adição de 5,6 mM de glicose promoveu aumento ($P < 0,05$) na proporção de embriões fêmeas que atingiram o estágio de blastocisto no D7 (Figura 5), e essa modificação do sistema de cultivo pode ser utilizada para a promoção de desvio dos sexos para fêmeas em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

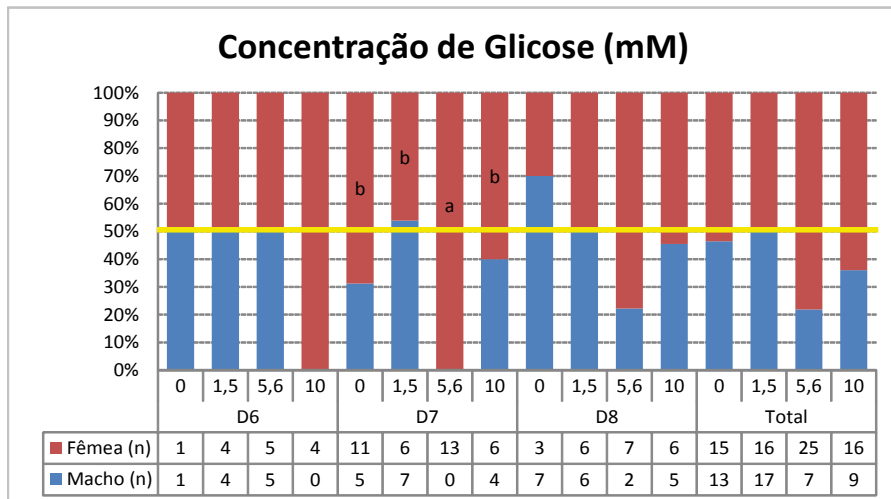


Figura 5. Número (n) e proporção dos sexos (%) em blastocistos bovinos nos Dias 6, 7 e 8 de cultivo e total após produção *in vitro* com adição de 0, 1,5, 5,6 ou 10 mM de glicose a partir do D5. ^{a,b}Valores com sobrescritos diferentes, diferem ao nível de significância de 5%.

Há relatos de que a adição de glicose prejudica a transição de mórula a blastocisto nas fêmeas, promovendo desvio para machos no estágio de blastocisto (LARSON et al., 2001; KIMURA et al., 2004, 2005; GREEN et al., 2016). Neste estudo, foram reportados achados contrários a esses relatos, pois a adição de 5,6 mM de glicose promoveu desvio para fêmeas. A atmosfera de cultivo, de 20% de O₂ versus 5% de O₂ (KIMURA et al., 2004; GREEN et al., 2016), pode explicar essas diferenças, pois a ocorrência de estresse, como o estresse oxidativo, favorece o desenvolvimento de fêmeas (PÉREZ-CRESPO et al., 2005), que possuem maior capacidade de detoxificação de ROS (PEIPPO et al., 2001). Além disso, as diferenças podem ser decorrentes da suplementação, no presente estudo, do meio de cultivo com fontes energéticas alternativas à glicose (glutamina, tri-citrato e myo-inositol), que podem afetar o equilíbrio das cascatas do metabolismo de glicose nos embriões (GARDNER et al., 2010; RUBESSA et al., 2011) ou até contribuir para a eliminação de ROS, como reportado para a glutamina (RIEGER, 1992).

Adição de DNP:

Os resultados de clivagem e desenvolvimento até blastocisto e as proporções dos sexos nos embriões obtidos após a adição de DNP no meio CIV a partir do D5 estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 6. A inclusão de DNP não promoveu alteração ($P > 0,05$) nas taxas de desenvolvimento até blastocisto (Tabela 2). Assim, no presente estudo, o DNP não afetou as taxas de desenvolvimento, enquanto há relatos de aumento das taxas de blastocisto promovido pelo DNP (THOMPSON et al., 2000; HARVEY et al., 2004; GREEN et al., 2016).

Tabela 2. Clivagem e desenvolvimento até blastocisto nos Dias 6, 7 e 8 e total, nos experimentos de produção *in vitro* de embriões bovinos após cultivo com adição de 0, 5, 10 e 30 μM de DNP a partir do D5.

DNP	Clivagem	Blastocisto			
		Dia 6	Dia 7	Dia 8	Total
0 μM	158/278	8/278	30/278	16/278	54/278
	(56,8%)	(2,9%)	(10,8%)	(5,8%)	(19,4%)
5 μM	152/271	4/271	32/271	21/271	57/271
	(56,1%)	(1,5%)	(11,8%)	(7,7%)	(21,0%)
10 μM	135/263	5/263	29/263	17/263	51/263
	(51,3%)	(1,9%)	(11,0%)	(6,5%)	(19,4%)
30 μM	139/271	2/271	34/271	13/271	49/271
	(51,3%)	(0,7%)	(12,5%)	(4,8%)	(18,1%)
P valor	P = 0,4031	P = 0,2779	P = 0,9171	P = 0,5388	P = 0,8598

Para os blastocistos no D6, foi detectada maior proporção ($P < 0,05$) de embriões machos no tratamento sem adição de DNP (controle) em comparação aos tratamentos com adição de DNP, e maior proporção ($P < 0,05$) de embriões fêmeas com a adição de 30 μM de DNP em relação ao grupo controle (Figura 6). Entretanto, o número de embriões obtidos no D6 foi muito pequeno e, portanto, as análises foram realizadas, respectivamente, a partir de seis e dois embriões, o que indica necessidade de cautela para a interpretação dos dados. Para os blastocistos obtidos nos Dias 7 e 8 e para o total de blastocistos, não houve efeito ($P > 0,05$) da adição de DNP sobre a proporção dos sexos dos embriões (Figura 6). Esses achados também foram contrários à literatura em que a adição de DNP promoveu aumento da proporção de embriões machos (GREEN et al., 2016).

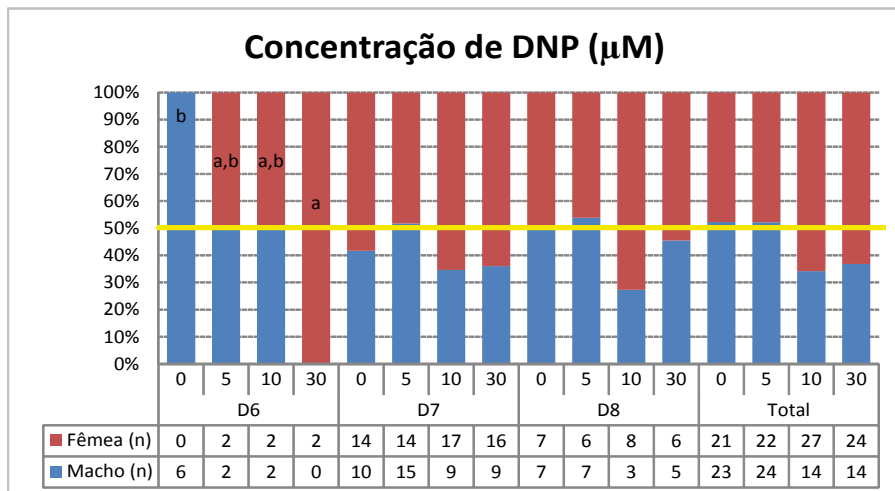


Figura 6. Número (n) e proporção dos sexos (%) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* obtidos nos Dias 6, 7 e 8 e total, em cultivo com adição de 0, 5, 10 e 30 μM de DNP a partir do D5. ^{a,b}Valores com sobrescritos diferentes, diferem ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher.

Alteração na concentração de oxigênio:

A modificação da atmosfera de oxigênio de 20% de O_2 (controle) para 5% de O_2 resultou em aumento ($P < 0,05$) nas taxas de desenvolvimento até blastocisto no D7 e na taxa total de blastocistos (Tabela 3), mas não promoveu efeito ($P > 0,05$) sobre a proporção dos sexos dos embriões (Figura 7).

Tabela 3. Clivagem e desenvolvimento até blastocisto nos Dias 6, 7 e 8 e total, de embriões bovinos produzidos *in vitro* após cultivo em atmosfera com 5% ou 20% de O_2 a partir do D1.

O_2	Clivagem	Blastocisto			
		Dia 6	Dia 7	Dia 8	Total
5%	302/641	10/641	86/641 ^a	36/641	132/641 ^a
	(47,1%)	(1,6%)	(13,4%)	(5,6%)	(20,6%)
20%	124/243	4/243	18/243 ^b	10/243	32/243 ^b
	(51,0%)	(1,6%)	(7,4%)	(4,1%)	(13,2%)
P valor	P = 0,3347	P = 1,000	P = 0,01833	P = 0,4669	P = 0,01476

O cultivo com 20% de O₂ expõe os embriões a condições de oxigênio muito superiores às fisiológicas, encontradas no útero bovino (HARVEY et al, 2004). O excesso de oxigênio pode levar ao desequilíbrio do estado redox celular e da quantidade de ROS, que prejudicam as taxas de desenvolvimento (RHO et al., 2007). Assim, a redução da atmosfera de oxigênio reduz o estresse oxidativo e leva a taxas maiores de desenvolvimento até blastocisto (KIMURA et al., 2004; RHO et al., 2007). Além disso, há relatos de que a inibição parcial da via de fosforilação oxidativa, por redução da atmosfera de oxigênio, é benéfica ao desenvolvimento (THOMPSON et al., 2000).

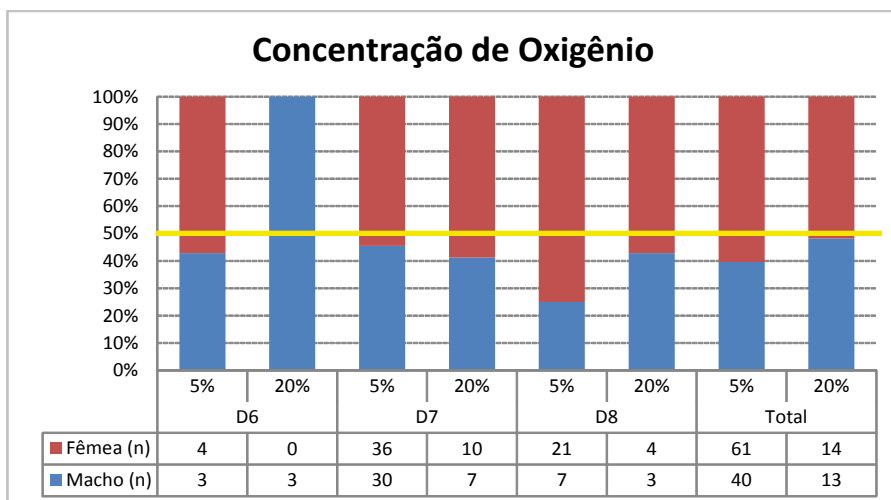


Figura 7. Número (n) e proporção dos sexos (%) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, obtidos nos Dias 6, 7 e 8 e total, após cultivo em atmosfera com 5% ou 20% de O₂ a partir do D1.

Em relação ao efeito do oxigênio sobre a proporção dos sexos, apesar de seu importante papel nas cascatas metabólicas, principalmente na fosforilação oxidativa, também não foram encontrados, na literatura, estudos que relatem desvios na proporção dos sexos dos embriões decorrentes da modificação da atmosfera de cultivo.

Coloração com BCB:

No D4, os embriões expostos ao BCB e classificados em três categorias (coloração azul forte – BCB+, coloração azul fraca – Intermediários e ausência de cor – BCB; Figura 8) foram comparados entre si e aos embriões não expostos ao BCB (Controle) quanto às taxas de desenvolvimento (Tabela 4) e à proporção dos sexos (Figura 9).

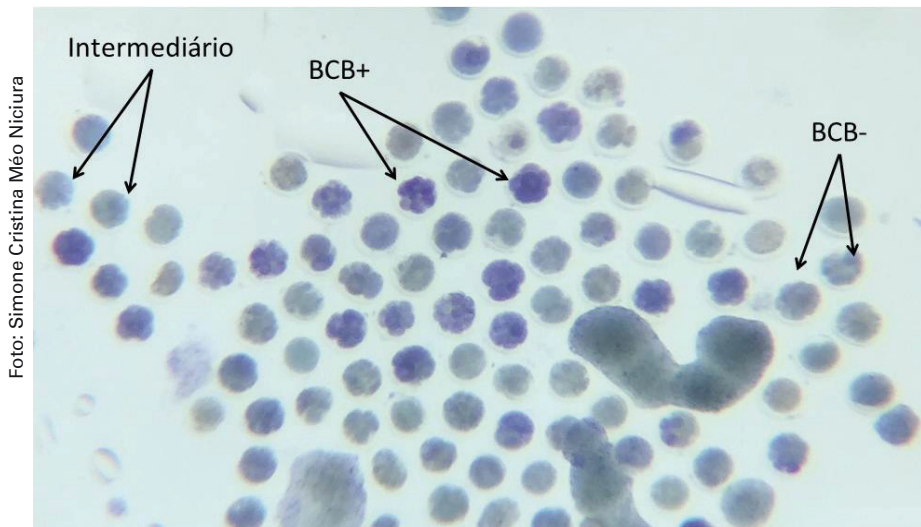


Foto: Simone Cristina Méo Niciura

Figura 8. Categorias de embriões bovinos produzidos *in vitro* corados com 26 μM de BCB por 90 min no D4: coloração azul forte (BCB+), coloração azul fraca (Intermediário) e ausência de cor (BCB-).

A exposição dos embriões ao BCB não afetou ($P > 0,05$) as taxas de desenvolvimento até blastocisto (Tabela 4), como pode ser observado pela comparação entre o grupo controle e o total de embriões obtidos após coloração com BCB (BCB+, Intermediário e BCB-). Dessa maneira, a incubação com BCB a 26 μM por 90 min não prejudica a viabilidade dos embriões expostos, assim como reportado para oócitos (PUJOL et al., 2004).

Os embriões corados com BCB no D4 que apresentaram coloração azul forte (BCB+) resultaram em maiores ($P < 0,05$) taxas de desenvolvimento até blastocisto que os demais grupos (Tabela 4). Dessa maneira, a coloração azul forte obtida após incubação com BCB pode ser usada para prever mais precocemente, nos estádios de dezesseis células a trinta e duas células, a viabilidade dos embriões e o potencial de desenvolvimento até blastocisto.

Tabela 4. Clivagem e desenvolvimento até blastocisto nos Dias 7 e 8 e total, após coloração ou não (Controle) com $26 \mu\text{M}$ de BCB por 90 min em SOF de embriões bovinos produzidos *in vitro*, no D4.

Tratamento	Clivagem	Blastocisto			
		Total	Dia 7	Dia 8	Total
BCB+			44/218 ^a (20,2%)	20/218 ^a (9,2%)	64/218 ^a (29,4%)
Intermediário	337/715 (47,1%)	84/666 (12,6%)	12/193 ^b (6,2%)	5/193 ^{b,c} (2,6%)	17/193 ^b (8,8%)
BCB-			1/255 ^c (0,4%)	2/255 ^c (0,8%)	3/255 ^c (1,2%)
Controle	140/327 (42,8%)	37/327 (11,3%)	26/327 ^b (8,0%)	11/327 ^b (3,4%)	37/327 ^b (11,3%)
P valor	P = 0,2181	P = 0,6282	P = 2,531e-14	P = 4,659e-05	P = 2,2e-16

BCB+: coloração azul forte; Intermediário: coloração azul fraca; BCB-: ausência de cor. ^{a,b,c} Valores com sobrescritos diferentes, diferem ao nível de significância de 5%.

A coloração com BCB tem sido usada, com sucesso, para a predição da qualidade de oócitos, em que quanto maior a coloração com BCB menor a atividade de *G6PD* e melhor a qualidade do oócito bovino (PUJOL et al., 2004; ALM et al., 2005; MIRSHAMSI et al., 2013). Para embriões, a coloração com BCB para a determinação da viabilidade de desenvolvimento foi utilizada em zigotos (MIRSHAMSI et al., 2013) e mórulas (IWATA et al., 2002). Entretanto, nesses estudos (IWATA et al., 2002; MIRSHAMSI et al., 2013), a ausência de coloração após incubação com BCB, ou seja, a alta atividade de *G6PD*, é que foi associada às maiores taxas de desenvolvimento, enquanto, no presente trabalho, a maior coloração com BCB, ou seja, a menor atividade de *G6PD*, foi associada à maior viabilidade embrionária. Como a coloração com BCB é capaz de discriminar a fase de crescimento e o estado

metabólico do embrião (MIRSHAMSI; SHABANKAREH, 2012), com base nestes resultados, é provável que o padrão metabólico do embrião de dezesseis células a trinta e duas células (no D4) seja diferente do padrão observado em zigotos e mórulas. Estudos de expressão gênica comprovam que a expressão do gene *G6PD* é variável entre os estádios de desenvolvimento e de maneira dependente da viabilidade embrionária, com aumento de *G6PD* até o estágio de dezesseis células e subsequente diminuição até mórula, nos embriões de maior viabilidade (KUMAR et al., 2013). Lembrando que *G6PD* é a enzima limitante da PPP (RIEGER, 1992), Javed e Wright (1991) também demonstraram que a atividade de PPP reduz de maneira mais marcante do estágio de seis células para dezesseis células e, posteriormente, para mórula em embriões de melhor qualidade, enquanto, para embriões de pior qualidade, a atividade de PPP permanece mais alta até o estágio de mórula. Assim, a coloração azul forte (BCB+) observada nos embriões de dezesseis células a trinta e duas células no D4 é compatível com a esperada redução da atividade de *G6PD* e de PPP em embriões de melhor qualidade e viabilidade.

Não houve diferenças ($P > 0,05$) na proporção dos sexos entre os embriões com diferentes padrões de coloração por BCB (Figura 9). Assim, a coloração com BCB não permite a identificação do sexo do embrião.

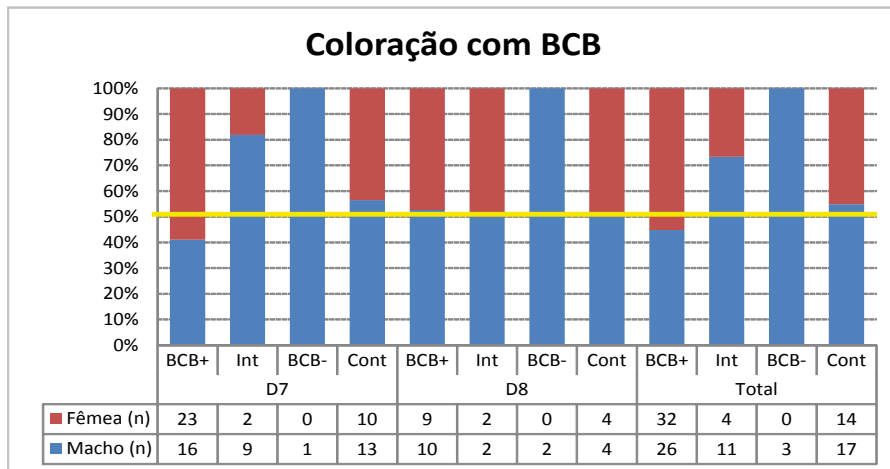


Figura 9. Número (n) e proporção dos sexos (%) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* obtidos nos Dias 7 e 8 e total após coloração com BCB ou não (Controle) dos embriões no D4. BCB+ : coloração azul forte; Int: coloração azul fraca; BCB-: ausência de cor.

Trabalhos de coloração com BCB para a sexagem de embriões foram realizados nos estádios de blastocisto em camundongos (WILLIAMS, 1986) e de oito células, dezesseis células, mórula e blastocisto em bovinos, com sucesso apenas para mórulas (IWATA et al., 2002). No presente estudo, a escolha do D4 (estádios de dezesseis células a trinta e duas células) para a coloração com BCB em bovinos foi baseada na hipótese de que, como a inativação do cromossomo X nas fêmeas tem início no estágio de blastocisto (DE LA FUENTE et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2002), a utilização de um estágio mais precoce, entre a ativação do genoma embrionário, que ocorre nos estádios de oito células a dezesseis células em bovinos (TELFORD et al., 1990), e a formação do blastocisto, aumentaria as chances de as fêmeas apresentarem os dois cromossomos ativos e, assim, produzirem mais *G6PD*, o que levaria a diferenças maiores na coloração com BCB entre fêmeas e machos. Além disso, nos relatos da literatura, foi utilizada a concentração de 13 μM de BCB por 15 min para bovinos (IWATA et al., 2002) e de 0,05 mg/mL ($\sim 130 \mu\text{M}$) por 15-20 min em camundongos (WILLIAMS, 1986), enquanto, no presente trabalho, a concentração de BCB (26 μM) e o tempo de incubação (90 min) foram escolhidos com

base em relatos prévios para a coloração de oócitos bovinos (PUJOL et al., 2004; ALM et al., 2005; MIRSHAMSI et al., 2013).

Ressalta-se que os embriões corados com BCB poderiam ter sido classificados em outras categorias além de BCB+, Intermediários e BCB-, visto que, em camundongos, foram utilizadas seis categorias de cor após exposição a BCB (WILLIAMS, 1986). Entretanto, apesar de haver mais gradações de cores azuis nos embriões, não foi possível separar com precisão os embriões em mais categorias somente pela observação em microscópio estereoscópico. Talvez essa separação pudesse ser feita com o auxílio de algum sistema de mensuração colorimétrica, o que poderia favorecer a discriminação pela cor dos embriões com maior precisão.

Expressão do gene *G6PD*:

Nos estudos de expressão gênica, o melhor gene de referência identificado pelo RefFinder foi a β -actina. Entretanto, a curva de desnaturação para esse gene não foi homogênea entre as amostras, provavelmente porque os primers utilizados anelam-se no mesmo éxon (éxon 3), de maneira a não evitar a amplificação de DNA genômico contaminante. Por esse motivo e considerando que o *GAPDH* foi o segundo melhor gene de referência pelo RefFinder, apresentou curva de desnaturação mais homogênea entre as amostras, foi amplificado em maior número de amostras por qPCR, apresentou menor variação de Cqs e seu uso para normalização do *G6PD* já foi reportado na literatura (SANDHU et al., 2016), o gene *GAPDH* foi escolhido como gene de referência para a normalização dos dados.

As diferenças de expressão relativa para o gene *G6PD* entre embriões machos e fêmeas estão apresentadas na Figura 10. Foi detectada maior expressão ($P < 0,05$) de *G6PD* nos machos no estágio de duas células; e maior expressão ($P < 0,05$) de *G6PD* nas fêmeas no estágio de oito células; e ausência de diferenças de expressão ($P > 0,05$) nos demais estádios (Figura 10).

A ausência de diferenças ($P > 0,05$) na expressão do gene *G6PD* entre embriões machos e fêmeas nos estádios de dezesseis células e trinta e duas células (Figura 10) pode também explicar porque a coloração com BCB no D4 (Figura 9) não obteve sucesso para a determinação do sexo dos embriões.

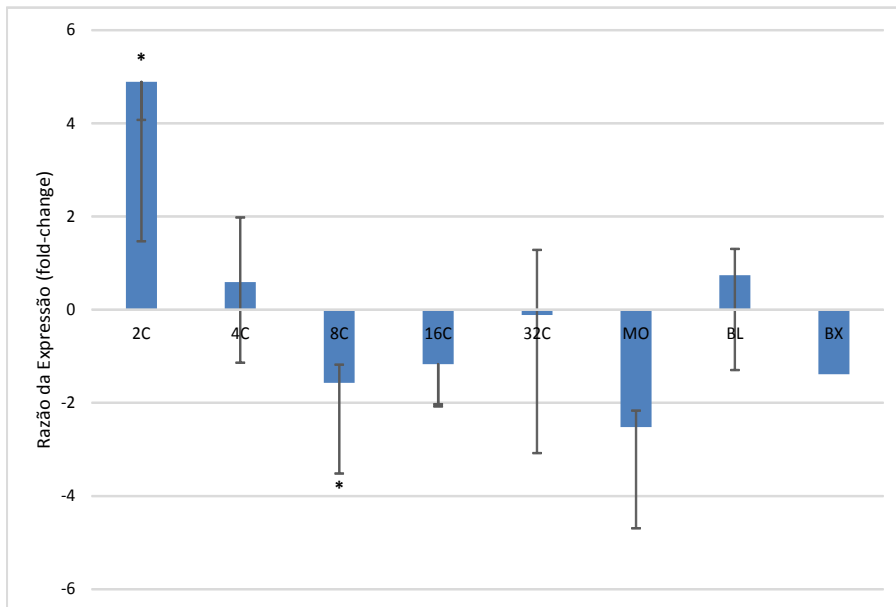


Figura 10. Expressão relativa do gene *G6PD*, normalizado pelo *GAPDH*, para embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estádios de duas células (2C), quatro células (4C), oito células (8C), dezesseis células (16C), trinta e duas células (32C), mórula (MO), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX). Embriões fêmeas foram usados como calibradores. * $P < 0,05$.

Na literatura, não havia sido relatada evidência de maior expressão do gene *G6PD* em machos em qualquer momento do desenvolvimento, como foi observado no estágio de duas células neste estudo. Além disso, outros trabalhos reportam maior expressão de *G6PD* nas fêmeas, em decorrência de dois cromossomos X ativos, no estágio de blastocisto (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; WRENZYCKI et al., 2002; LOPES et al., 2007), enquanto não foram detectadas, neste trabalho, diferenças de expressão desse gene entre blastocistos machos e

fêmeas. Entretanto, os estudos reportados na literatura foram baseados em técnicas semi-quantitativas (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; WRENZYCKI et al., 2002), a partir de pool de embriões (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; PEIPPO et al., 2002) ou após cultivo em atmosfera de 5% de O₂ (WRENZYCKI et al., 2002; LOPES et al., 2007), o que pode refletir efeitos das técnicas ou das condições de cultivo sobre a expressão gênica. Em búfalos, já foi observado que a concentração de glicose utilizada durante a maturação também interfere na expressão do gene *G6PD* (KUMAR et al., 2013).

Neste trabalho, foram utilizados embriões individuais e sem pré-amplificação do mRNA ou do cDNA, e a quantidade de material genético utilizada pode ter sido insuficiente para análises mais robustas. Dessa maneira, sugere-se que novos experimentos com pool de embriões sejam realizados para a confirmação dos dados. Outro problema é que, apesar do uso recente do *GAPDH* como gene de referência em estudos similares em búfalos (SANDHU et al., 2016), há evidências da ocorrência de variação na expressão de *GAPDH* entre embriões machos e fêmeas (GARCIA-HERREROS et al., 2012) e, portanto, outros genes de referência devem ser avaliados.

Combinando os achados dos diferentes experimentos aqui reportados, podemos assumir que provavelmente ocorre interação entre os tratamentos, pois alguns deles influenciam as vias metabólicas energéticas do embrião e outros são regulados por elas. Assim, para a melhor compreensão dos eventos e comparação aos achados reportados na literatura, sugere-se que novos estudos sejam realizados com a combinação dos tratamentos de velocidade de desenvolvimento, glicose, DNP, atmosfera de oxigênio, coloração com BCB e expressão do gene *G6PD*. Maior enfoque deve ser dado, principalmente, à observação do efeito, na proporção dos sexos, da interação entre a atmosfera de oxigênio e as demais alterações no sistema de cultivo.

Conclusões

A velocidade com que o embrião bovino produzido *in vitro* atinge cada estágio do desenvolvimento, de oito células a blastocisto expandido, não permite a identificação do sexo do embrião. A adição de 5,6 mM de glicose ao meio SOF, a partir do D5 de cultivo *in vitro*, aumenta a proporção de embriões fêmeas nos blastocistos formados no D7, sem prejudicar as taxas de desenvolvimento. A adição de DNP ao meio de cultivo a partir do D5 não afeta a proporção dos sexos dos embriões e nem as taxas de desenvolvimento. A alteração da atmosfera de cultivo *in vitro* para 5% de O₂ a partir do D1, apesar de não afetar a proporção dos sexos dos embriões, aumenta as taxas de desenvolvimento até blastocisto. A coloração com BCB no D4 não permite a precisa diferenciação, sob microscópio estereoscópico, entre embriões machos e fêmeas. Entretanto, a coloração azul forte observada após a exposição ao BCB dos embriões no D4 pode ser utilizada como indicador da viabilidade do embrião e do potencial em atingir o estágio de blastocisto. Os embriões machos e fêmeas de duas células e oito células possuem padrão diferencial de expressão para o gene *G6PD*, com maior expressão em machos no estágio de duas células e em fêmeas, em oito células.

Agradecimentos

Financiamento Embrapa – Macroprograma 1 “Alternativas para sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV)” (Código n°. 01.13.06.001.03.01.003); bolsa PIBIC/CNPq (Processos n°. 163409/2015-3 e 145935/2016-7).

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, v. 40, n. 1, p. 51-56, Feb. 2005.

ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I. M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, May 2005.

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1-2, p. 48-61, Aug. 2008.

BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 341-345, Jan. 2007.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 2, p. 169-172, Mar. 1996.

DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 3, p. 769-775, Mar. 1999.

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I. M.; RATH, D.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Differential glycolytic and glycogenogenic transduction pathways in male and female bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 2, p. 344-352, 2012.

GARDNER, D. K.; LARMAN, M. G.; THOUAS, G. A. Sex-related physiology of the preimplantation embryo. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 8, p. 539-547, May 2010.

GREEN, M. P.; HARVEY, A. J.; SPATE, L. D.; KIMURA, K.; THOMPSON, J. G.; ROBERTS, R. M. The effects of 2,4-dinitrophenol and D-glucose concentration on the development, sex ratio, and interferon-tau (IFNT) production of bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 1, p. 50-60, Jan. 2016.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, n. 5, p. 1117-1126, Mar. 2001.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; OBTER, M.; MARTÍNEZ-MADRID, B.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female *in vitro*-produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 2, p. 146-151, Feb. 2000.

HARVEY, A. J.; KIND, K. L.; THOMPSON, J. G. Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol on hypoxia-inducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 16, n. 7, p. 665-673, Sep. 2004.

HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285-1299, Dec. 1998.

IWATA, H.; KIMURA, K.; HASHIMOTO, S.; OHTA, M.; TOMINAGA, K.; MINAMI, N. Role of *G6PD* activity on sex ratio and developmental competence of bovine embryos under oxidative stress. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 5, p. 447-453, Oct. 2002.

JAVED, M. H.; WRIGHT Jr., R. W. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 1029-1037, May 1991.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 93-107, July 2000.

KIM, J. H.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K.; OKUDA, K. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 875-886, April 1993.

KIMURA, K.; IWATA, H.; THOMPSON, J. G. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 228-238, Jan. 2008.

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 and Development**, v. 72, n. 2, p. 201-207, Oct. 2005.

KIMURA, K.; SPATE, L. D.; GREEN, M. P.; ROBERTS, R. M. Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN- τ by bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 1, p. 88-95, May 2004.

KUMAR, P.; RAJPUT, S.; VERMA, A.; DE, S.; DATTA, T. K. Expression pattern of glucose metabolism genes in relation to development rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and in vitro-produced embryos. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 914-922, Nov. 2013.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: a comparative study. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 400-405, Feb. 2004.

LARSON, M. A.; KIMURA, K.; KUBISCH, H. M.; ROBERTS, R. M. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9677-9682, Aug. 2001.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p. 159-167, Sep. 1999.

LOPES, A. S.; WRENZYCKI, C.; RAMSING, N. B.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H.; LOVENDAHL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Respiration rates correlate with mRNA expression of *G6PD* and *GLUT1* genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 223-236, July 2007.

MAPLETOFT, R. J.; HASLER, J. F. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. **Revue Scientifique et Technique**, v. 24, n. 1, p. 393-403, Apr. 2005.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLIAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-95, July 2004.

MIRSHAMSI, S. M.; KARAMISHABANKAREH, H.; AHMADI-HAMEDANI, M.; SOLTANI, L.; HAJARIAN, H.; ABDOLMOHAMMADI, A. R. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 245-251, Jan. 2013.

MIRSHAMSI, S. M.; SHABANKAREH, H. K. Selection of developmentally competent sheep zygotes using the brilliant cresyl blue (BCB) test, after IVF. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 250-254, June 2012.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; CRUZ, M. H. C.; MAZETI, B.; OLIVEIRA, L. Z.; LOPES, F. L.; GARCIA, J. M. HDAC inhibition decreases XIST expression on female IVP bovine blastocysts. **Reproduction**, v. 145, n. 1, p. 9-17, 2013.

PEIPPO, J.; FARAZMAND, A.; KURKILAHTI, M.; MARKKULA, M.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 923-929, Oct. 2002.

PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, n. 2, p. 105-113, May 2001.

PÉREZ-CRESPO, M.; RAMÍREZ, M. A.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R.; RIZOS, D.; LONERGAN, P.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 4, p. 502-510, Dec. 2005.

PERRY, G. 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 31, p. 24-46, Dec. 2013. Disponível em: <[https:// www.iets.org/pdf/comm_data/december2013.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/december2013.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2016.

PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n. 4, p. 14-26, Dec. 2014. Disponível em: <[https:// www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2016.

PERRY, G. 2014 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 33, n. 4, p. 9-18, Dec. 2015. Disponível em: <[https:// www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2016.

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, May 2002. NAR Methods Online, e36.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M. T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735-744, Feb. 2004.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, Mar. 2003.

RATTANASUK, S.; PARNPAI, R.; KETUDAT-CAIRNS, M. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 539-542, Sep. 2011.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 75-93, Jan. 1992.

RHO, G. J.; Balasubramanian, S.; KIM, D. S.; SON, W. J.; CHO, S. R.; KIM, J. G.; Mohana Kumar, B.; CHOE, S. Y. Influence of *in vitro* oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 4, p. 486-496, Apr. 2007.

RUBESSA, M.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; LONGOBARDI, V.; ALBARELLA, S.; TATEO, A.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of energy source during culture on *in vitro* embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1347-1355, Oct. 2011.

SANDHU, A.; MOHAPATRA, S. K.; AGRAWAL, H.; SINGH, M. K.; PALTA, P.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S. Effect of sex of embryo on developmental competence, epigenetic status, and gene expression in buffalo (*Bubalis bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. **Cellular Reprogramming**, v. 18, n. 5, p. 356-365, Oct. 2016.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, n. 1, p. 90-100, May 1990.

THOMPSON, J. G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H. R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 47-55, Jan. 2000.

TIFFIN, G. J.; RIEGER, D.; BETTERIDGE, K. J.; YADAV, B. R.; KING, W. A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 125-132, Sep. 1991.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. de A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, supl. 2, p. 661-674, 2010.

WANG, L.; JIANG, X.; WU, Y.; LIN, J.; ZHANG, L.; YANG, N.; HUANG, J. Effect of milrinone on the developmental competence of growing lamb oocytes identified with brilliant cresyl blue. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 2020-2027, Nov. 2016.

WILLIAMS, T. J. A technique for sexing mouse embryos by visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Theriogenology**, v. 25, n. 5, p. 733-739, May 1986.

WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; KORSawe, K.; NIEMANN, H. *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts *G6PD*, *PGK*, and *Xist* in preimplantation bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 127-134, Jan. 2002.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, Sep. 2012.



Pecuária Sudeste

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE: 14242