

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, n.3, p.594-599, 2008

Falha na sexagem por inibição do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* com anticorpos anti H-Y

[Failure of sexing by developmental arrest of bovine embryos *in vitro* produced with H-Y antisera]

M.V. Resende¹, C.A. Moreira-Filho², C.L.V. Leal³, M.F.P.D. Ramalho⁴, A.O. Almeida¹,
R. Vantini¹, V.F.M. Hossepian de Lima¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane km5
14884-900 – Jaboticabal, SP

²Instituto de Ciências Biomédicas - USP – São Paulo, SP

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP – Pirassununga, SP

⁴Centro Universitário Anhanguera - UNIFIAN – Leme, SP

RESUMO

Embriões bovinos produzidos *in vitro*, em estágio de mórula, foram cultivados em meio contendo anticorpos anti H-Y de alto título proveniente de ratos por 24h e, após este tempo, classificados em dois grupos: 1) embriões inibidos em estágio de mórula (classificados como machos) e 2) embriões que se desenvolveram e formaram a blastocoele (classificados como fêmeas). O sexo de 311 embriões, distribuídos em três grupos de concentração dos anticorpos, 3%, 5% ou 7%, foi identificado pela reação em cadeia da polimerase. Não houve desvio da proporção entre machos e fêmeas ($P>0,05$) nos grupos em que se utilizaram os anticorpos anti H-Y, quando comparadas ao grupo-controle, sem adição de anticorpos anti H-Y. Diferentemente dos resultados obtidos utilizando-se embriões bovinos produzidos *in vivo*, a sexagem com anticorpos anti H-Y de alto título em embriões produzidos *in vitro* não propiciou sucesso.

Palavras-chave: bovino, sexagem de embriões, inibição do desenvolvimento, anticorpos anti H-Y, fecundação *in vitro*

ABSTRACT

In vitro produced bovine embryos at morula stage were cultured in medium containing high titer of rat H-Y antisera for 24h. The embryos were classified in two groups: 1) embryos arrested at morula stage (classified as males); and 2) embryos that developed and formed a blastocoele (classified as female). The sex of 311 embryos, divided in three groups of concentration of H-Y antisera, 3%, 5% or 7%, was identified by polymerase chain reaction. The results showed no difference ($P>0.05$) on sexual deviation in groups in which the H-Y antisera was added, in relation to control group, in which no H-Y antisera was added. In contrast with results obtained with *in vivo* produced bovine embryos, the sexing of *in vitro* produced bovine embryos with high H-Y antisera titer did not succeed.

Keywords: bovine, embryo sexing, developmental arrest, H-Y antisera, *in vitro* fertilization

INTRODUÇÃO

A seleção do sexo de embriões bovinos pré-implantados produzidos *in vitro* pode aumentar o ganho genético em programas de acasalamento

(Faber et al., 2003) e diminuir o custo do teste de progênie (Nicholas e Smith, 1983) em bovinos destinados à produção de leite ou carne (Van Vleck et al., 1987). Além disso, a sexagem de embriões pode desviar a proporção entre machos e fêmeas em favor das fêmeas, solucionando a

Recebido em 14 de maio de 2007

Aceito em 6 de março de 2008

E-mail: mvresende@yahoo.com.br

principal desvantagem do cultivo *in vitro* de embriões que é o desenvolvimento mais rápido de machos (Avery e Schmidt, 1989).

A sexagem de embriões pode ser feita de duas formas: a) métodos invasivos, que incluem análise citogenética, análise de DNA de seqüências específicas do cromossomo Y utilizando hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e PCR; b) métodos não-invasivos, como a quantificação de enzimas ligadas ao cromossomo X e a detecção por ensaios imunológicos do antígeno H-Y masculino. A aplicação de métodos invasivos para a sexagem de embriões é limitada devido a regras sanitárias específicas, pois a zona pelúcida é rompida após a biópsia, impedindo sua comercialização internacional (Ramalho et al., 2004).

Entretanto, embriões masculinos e femininos produzidos *in vitro* apresentam taxas de desenvolvimento e expressão de genes diferentes se comparados com embriões produzidos *in vivo*. Essas diferenças incluem modificações morfológicas e atividade genômica (Gutierrez-Adan et al., 2000).

Considerando-se as leis de controle de doenças e a dificuldade de se conduzir a sexagem de embriões em condições de campo (Ramalho et al., 2004), o objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de anticorpos anti H-Y de alto título produzidos em ratos em induzir a inibição do desenvolvimento de embriões bovinos, na tentativa de selecionar o sexo durante a produção *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de anticorpos anti H-Y, oito ratas da linhagem isogênica Wistar Furth, com 45 a 55 dias de idade, foram imunizadas com leucócitos do baço de machos de mesma linhagem. Cada animal recebeu uma injeção intraesplênica (0,08ml) de 4×10^7 células diluídas em PBS suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Essas fêmeas receberam uma injeção intraperitoneal de reforço (0,1ml, 4×10^7 células) 18 dias após a primeira injeção intraesplênica. Após 10 dias, as ratas imunizadas foram sangradas para obtenção e titulação do soro por ELISA (Moreira-Filho e Wachtel, 1985).

Iniciou-se o ELISA pela adição de 100µl de antígeno H-Y solúvel (sobrenadantes de células de TM-4; Brunner et al., 1984) em cada poço de uma placa de poliestireno para microtitulação¹, permanecendo a 4°C por 12h. A placa foi lavada por três vezes com PBS + 0,05% de albumina sérica bovina (BSA²), pH 7,2, e uma vez com PBS contendo 3% de BSA (pH 7,2) por 3h a 37°C e lavada novamente por três vezes. Os anticorpos primários (anticorpos anti H-Y) foram adicionados após diluição serial (1:8 a 1:2.048) em PBS + 1% de BSA. Após a incubação por 60min em gelo, a placa foi lavada três vezes com PBS + 0,05% de BSA, adicionando-se em cada poço anticorpo secundário contra imunoglobulina de rato conjugado com peroxidase³, diluído 1:3000 em PBS + 1% BSA. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 60min e lavada três vezes com PBS + 0,05% de BSA. Os poços foram preenchidos com substrato – 1mg/ml de ortofenildiamina⁴ + 1µl/ml de 30% de peróxido de hidrogênio⁵ diluído em 0,1M, pH 4,5 de tampão citrato - e mantidos sob agitação constante, no escuro, por 15min. A reação foi interrompida com a adição de 100µl de ácido sulfúrico 4N. A reação foi lida imediatamente em um leitor de absorvância⁶ com comprimento de onda de 490nm.

A densidade óptica (DO) dos anticorpos era ≥ 1.1 na diluição de 1:256, e o ponto de corte dos soros foi um soro negativo de uma rata não submetida à imunização. Os soros com $DO \geq 1.1$ alcançaram título com diluição de 1:1.024 a 1:2.048. Os soros das ratas, não misturados entre si, não foram adsorvidos com células de fêmeas isogênicas antes da sexagem (Hossepian de Lima et al., 1993).

Os reagentes e meios utilizados para a produção *in vitro* de embriões foram adquiridos da Sigma², exceto aqueles indicados.

Ovários bovinos foram transportados de abatedouros ao laboratório em solução salina a uma temperatura de 28 a 35°C. Folículos antrais,

¹Linbro/Titertek. Flow Laboratories Inc. McLean, EUA.

²Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA.

³Goat Anti-Rat Ig (H + L) HRP. Southern Biotech Associates. Alabama, EUA.

⁴Streptavidin. Bethesda Research Laboratories. Bethesda, EUA.

⁵Perdrogen 30. Riedel-de Haën. Seelze, Alemanha.

⁶MRC-TC Plus. Dynex Technologies. Virginia, EUA.

3 a 7mm, foram aspirados manualmente com uma agulha de 18-gauge acoplada a uma seringa de 20ml. Os oócitos com *cumulus* compacto e pelo menos com quatro camadas foram selecionados para a maturação *in vitro* (MIV). Grupos de 20 a 25 oócitos foram colocados em gotas de 100µl do meio sob óleo mineral. O meio de MIV foi o TCM-199⁷, suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor (55°C por 30min), FSH (1,0µg/µl, Ovagen⁸), hCG(10U/ml, Profasi HP⁹), estradiol (1,0µg/ml), piruvato de sódio (0,25mM) e 16,67µg/µl de amicacina¹⁰ (75µg/ml). Os oócitos foram cultivados por 24 a 26h à temperatura de 38,5°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Para a fecundação *in vitro* (FIV), o sêmen foi descongelado a 35°C por 40seg. Os espermatozoides móveis foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade descontínuo (45%:90%) de Percoll¹¹) por 30min a 900xg. Espermatozoides viáveis foram colhidos da parte inferior da fração de 90% do gradiente, foram contados e diluídos em meio FIV (100 x 10³ células para uma gota de FIV de 90µl), e incubados por 60min para capacitação. Os oócitos foram lavados três vezes em meio TCM-199⁸ suplementado com 25mM de HEPES, 100mM de piruvato de sódio, BSA¹² (10mg/ml; fração V, livre de ácidos graxos) e uma vez em meio FIV. Os oócitos e os espermatozoides foram incubados por 20h em 5% de CO₂, em atmosfera úmida à temperatura de 38,5°C. Os prováveis zigotos foram desnudados por repetidas pipetagens, lavados três vezes no meio modificado “synthetic oviduct fluid” (SOF; Vajta et al., 1999), e transferidos para 500µl de meio SOF em uma placa de quatro poços. O cultivo dos embriões foi realizado sob óleo mineral na atmosfera úmida de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ a 38,5°C por aproximadamente cinco dias, quando os embriões alcançaram o estágio de mórula. Durante o cultivo *in vitro*, não foi adicionado SFB, como descrito previamente (Gutierrez-Adan et al., 2001).

Realizaram-se cinco repetições, em diferentes dias, utilizando-se três concentrações do soro contendo anticorpos anti H-Y: 3% de soro, com 113 embriões, 5% de soro com 96 embriões e 7% de

soro com 102 embriões. Em um primeiro teste foi adicionado 10% de soro contendo anticorpos anti H-Y no meio de cultivo, no entanto, os embriões degeneraram e, desse modo, reduziu-se a concentração máxima do soro. Aproximadamente cinco dias após a FIV, os anticorpos anti H-Y foram adicionados no meio de cultivo contendo embriões bovinos. O grupo-controle, com 115 embriões, foi incubado sem anticorpos anti H-Y. Este grupo-controle foi necessário para monitoramento do desvio da proporção entre machos e fêmeas para machos durante o cultivo *in vitro* e para verificar a partenogênese. Os grupos da sexagem e o controle foram incubados a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ por 24h.

Após esse período, os embriões do grupo da sexagem foram separados em dois grupos, de acordo com o estágio de desenvolvimento alcançado após a incubação em meio contendo anticorpos anti H-Y. Embriões inibidos em estágio de mórula, presumidamente H-Y positivos e classificados como machos, constituíram o grupo 1; embriões que progrediram para o estágio de blastocisto, presumidamente H-Y negativos e classificados como fêmeas, constituíram o grupo 2.

Para a determinação do sexo genético dos embriões pela PCR, 311 embriões dos grupos da sexagem e 115 embriões do grupo-controle (sem adição de soro contendo anticorpos anti H-Y) foram colocados em tubos de 0,2ml para PCR contendo 10µl de água ultra-pura autoclavada. Posteriormente, foi adicionada Proteinase K¹³ na concentração final de 50µg por embrião. Os tubos foram incubados a 37°C por 60min (para ação da enzima) e a 98°C por 10min (para inativação da enzima). Dois pares de “primers” Y-específicos foram adicionados em duas amostras distintas. O primeiro par foi: 5' - CCT CCC CTT GTT CAA ACG CCC GGA ATC ATT - 3' e 5' - TGC TTG ACT GCA GGG ACC GAG AGG TTT GGG - 3' (Bondioli et al., 1989); e o segundo par foi: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3' (Schwerin et al., 1991; Luz et al., 2000). O primeiro par detecta uma seqüência de 210pb do cromossomo Y bovino e o segundo, uma seqüência de 196pb do cromossomo Y. Um terceiro par detecta uma seqüência autossômica de 280pb, indicando a presença de DNA genômico bovino. O terceiro par foi: 5' - AGG TCG CGA GAT TGG TCG CTA GGT CAT GCA - 3' e 5' - AAG ACC TCG AGA GAC CCT CTT CAA CAC GT - 3'

⁷Gibco BRL. Grand Island, EUA.

⁸Immuno-Chemical Products Ltd. Auckland, Nova Zelândia.

⁹Laboratoires Serono S.A. Aubonne, Suíça.

¹⁰Aminocina. Instituto Biochimico Ltda.. São Paulo, Brasil.

¹¹Amersham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Suécia.

¹²Inlab. São Paulo, Brasil

¹³Invitrogen. Carlsbad, EUA.

Falha na sexagem por inibição...

(Ellis e Harpold, 1986; Ellis et al., 1988). “PCR multiplex” foi realizada em um mesmo tubo com o primeiro (210pb) e o terceiro (280pb) “primers”, a PCR com o segundo par de “primers” (196pb) o foi em outro tubo. As ampliações foram feitas em um termociclador¹⁴, da seguinte forma: a) para o primeiro e terceiro par de “primers”: um passo inicial a 94°C por 5min, 40 ciclos a 94°C por 1min de desnaturação, anelamento a 58°C por 30seg e síntese a 72°C por 1min, e uma extensão final de 7min a 72°C, com total de 40 ciclos; b) para o segundo par de “primers”, um passo inicial de 94°C por 5min, 38 ciclos a 94°C por 1min de desnaturação, anelamento a 58°C por 1min e síntese a 72°C por 1min e uma extensão final de 7min a 72°C, total de 38 ciclos.

Os resultados obtidos a partir da identificação do sexo genético dos embriões foram submetidos à análise estatística pelo teste do qui-quadrado a 5% de significância. Confrontou-se, separadamente, cada grupo da sexagem - 3%, 5% ou 7% de soro

contendo anticorpos anti H-Y durante a produção *in vitro* dos embriões - com o grupo-controle - não adicionado soro contendo anticorpos anti H-Y -, verificando-se o desvio da proporção entre machos e fêmeas dos embriões em estágio de mórulas (classificados como machos) e em estágio de blastocistos (classificados como fêmeas).

RESULTADOS

A identificação de embriões e os resultados da PCR de 311 embriões cultivados em meio contendo anticorpos anti H-Y são apresentados na Fig. 1 e na Tab. 1. Ocorreram falhas em inibir o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, pois não houve diferença quando se comparou com a proporção entre machos e fêmeas obtida no grupo-controle, que foi de 54% de machos e de 46% de fêmeas em 115 embriões. Desse modo, não houve necessidade de comparar os grupos da sexagem entre si.

Tabela 1. Resultados da PCR após a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* por inibição do desenvolvimento por anticorpos anti H-Y

Estádio do embrião (sexo provável)	Embrões sexados pela PCR - n (%)												
	Grupo de 3% de anticorpos anti H-Y		Grupo de 5% de anticorpos anti H-Y				Grupo de 7% de anticorpos anti H-Y				Grupo-controle		
	n	Macho	Fêmea	n	Macho	Fêmea	n	Macho	Fêmea	n	Macho	Fêmea	
Mórula (macho)	61	29a (47,5%)	32a (52,5%)	43	22a (51,1%)	21a (48,9%)	50	23a (46%)	27a (54%)				
Blastocistos (fêmea)	52	30a (57,7%)	22a (42,3%)	53	28a (52,3%)	25a (47,7%)	52	26a (50%)	26a (50%)				
Total de embriões	113	-	-	96	-	-	102	-	-	115	61 (54%)	54 (40%)	

Letras iguais na linha, dentro de cada grupo, indicam que não houve diferença na proporção de sexos (P>0,05)

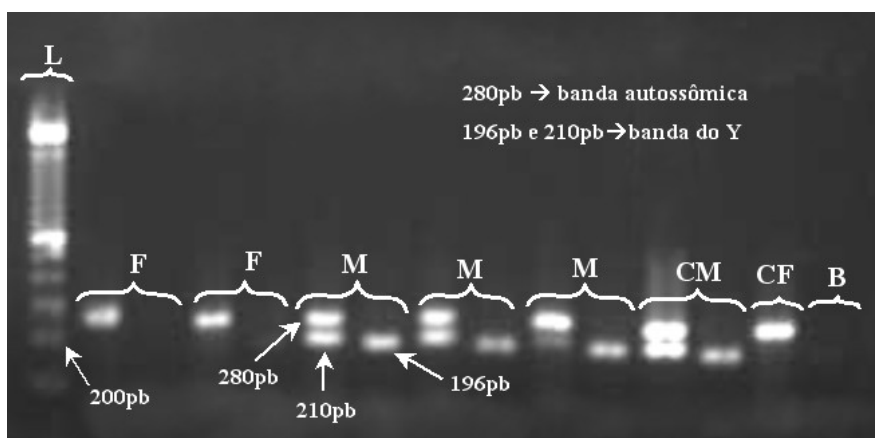


Figura 1. Gel de agarose a 1,5% com os produtos da PCR de embriões sexados, visualizando-se fragmentos de 280pb (banda autossômica), 196pb (banda do Y) e 210pb (banda do Y), [L (marcador de peso molecular 100pb), F (embrião fêmea), M (embrião macho), CM (controle macho), CF (controle fêmea) e B (branco – sem amostra de DNA)].

¹⁴MJ Research PTC 100 Thermal Cycler. GMI Inc. Minnesota, EUA.

DISCUSSÃO

O aperfeiçoamento de técnicas imunológicas para a sexagem de embriões depende da obtenção de soro que contenha altos títulos de anticorpos anti H-Y e do desenvolvimento de protocolos simples para minimizar a manipulação dos embriões (Shalev et al., 1978; Bradley e Heslop, 1985; Ramalho et al., 2004). Muitos dos anticorpos policlonais produzidos em camundongos ou ratos apresentam baixo título, limitando a eficiência da sexagem de embriões. Além disso, a produção de anticorpos monoclonais não melhora significativamente a acurácia na determinação do sexo de embriões bovinos (Hossepian de Lima et al., 1993).

No presente estudo, anticorpos anti H-Y policlonais de rata com alto título foram produzidos e usados com $DO \geq 1.1$ na diluição de 1:256 para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Confirma-se, desse modo, que a imunização intraesplênica em ratos isogênicos, com células esplênicas de machos de mesma linhagem, promove uma forte resposta contra o H-Y (Bradley e Heslop, 1985; Ramalho et al., 2004).

No protocolo usado, os anticorpos anti H-Y não foram adsorvidos com células de ratos antes do seu uso no procedimento de sexagem. Vários autores recomendam a adsorção na tentativa de reduzir as reações inespecíficas (Utsumi e Iritani, 1986; Utsumi et al., 1993). No entanto, as observações de Hossepian de Lima et al. (1993), que adsorveram e não adsorveram os anticorpos anti H-Y, não diferiram significativamente em relação a sua eficiência. De outro modo, está confirmado que a imunização intraesplênica promove forte resposta na produção de anticorpos policlonais anti H-Y de alto título como proposto por Bradley e Heslop (1985).

Ao trabalharem com embriões produzidos *in vivo* de camundongos e bovinos, Ramalho et al. (2004) conseguiram em torno de 80% de identificação correta entre mórulas e blastocistos. Com mórulas bovinas produzidas *in vitro*, Gardon et al. (2004) conseguiram 81,7% de identificação correta na sexagem, utilizando anticorpos anti H-Y policlonais adicionados de complemento, que foi produzido em porquinho da Guiné. No entanto, diferentemente do método proposto neste estudo, Gardon et al. (2004)

relataram que em torno de 59% dos embriões degeneraram após o tratamento devido à utilização do complemento. Este fato, que descaracteriza a técnica como sendo somente de inibição do desenvolvimento, impede o uso dos embriões bovinos machos em programas de acasalamento em que este sexo é o desejado.

Os resultados diferem dos citados na literatura e podem ser atribuídos à qualidade morfológica mais baixa dos embriões produzidos *in vitro* quando comparada com a dos embriões produzidos *in vivo*. As possíveis explicações para o insucesso dessa técnica podem ser resultado da baixa qualidade das mórulas produzidas *in vitro* e da clivagem assíncrona, que aumenta a porcentagem de falso-positivos (Wright e Ellington, 1995; Rizo et al., 2001), ou, também, da influência do meio de cultivo usado durante a produção *in vitro* dos embriões com anticorpos anti H-Y. Uma outra hipótese, para justificar os resultados do presente trabalho, pode ser atribuída às alterações na expressão de genes e moléculas que são responsáveis pela correta ação de antígenos de histocompatibilidade, como o antígeno H-Y. Por exemplo, uma das funções da beta-2-microglobulina é ligar o antígeno H-Y na superfície celular (Fellous et al., 1978; Tanaka et al., 2005). Pelo menos em embriões clonados, foi verificada uma expressão anormal nos antígenos de histocompatibilidade classe I (Hill et al., 2002).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio parcial (bolsa de estudo - Brasil).
À Dra. Maria Notomi Sato – USP – São Paulo, pela doação dos ratos isogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVERY, B.; SCHMIDT, M. Sex determination of bovine embryos using H-Y antisera. *Acta Vet. Scand.*, v.30, p.155-164, 1989.
- BONDIOLI, K.R.; 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, p.95-104, 1989.
- BRADLEY, M.P.; HESLOP, B.F. Elicitation of a rapid and transient antibody response to H-Y antigens

- by intrasplenic immunization. *Transplantation*, v.39, p.634-638, 1985.
- BRUNNER, M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; WACHTEL, G. et al. On the secretion of the H-Y antigen. *Cell*, v.37, p.615-619, 1984.
- ELLIS, S.B.; BONDIOLI, K.R.; WILLIAMS, M.E. et al. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. *Theriogenology*, v.29, p.242, 1988.
- ELLIS, S.B.; HARPOLD, M.M. *Nucleic acid probes for prenatal sexing*. Geneva: International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) World Intellectual Property Organization, 1986. (Publication no. WO 86/07095).
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L. et al. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, v.59, p.125-138, 2003.
- FELLOUS, M.; GUNHER, E.; KEMLER, R. et al. Association of the H-Y male antigen with β 2-microbulin on human lymphoid and differentiated mouse tetarocarcinoma cell lines. *J. Exp. Med.*, v.147, p.58-70, 1978.
- GARDON, J.C.; AGUERA, A.; CASTEJON, F. Sexing in vitro produced bovine embryos, at different stages of development, using rat H-Y antiserum. *Theriogenology*, v.62, p.35-43, 2004.
- GUTIERREZ-ADAN A.; LONERGAN, P.R.; RIZOS, D. et al. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v.55, p.1117-1126, 2001.
- GUTIERREZ-ADAN, A.; OTER, M.; MARTINEZ-MADRID, B. et al. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol. Reprod. Dev.*, v.55, p.146-151, 2000.
- HILL, J.R.; SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J. et al. Abnormal expression of trophoblast Major Histocompatibility Complex Class I Antigen in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, v.67, p.55-63, 2002.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; DE BEM, A.R. et al. Sex determination of murine and bovine embryos using cytotoxicity and immunofluorescence assays. *Theriogenology*, v.39, p.1343-1352, 1993.
- LUZ, M.R.; WATANABE, Y.F.; FERRO, J.A. et al. Sexing in vitro fertilized bovine embryos by multiplex PCR. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, p.453-456, 2000.
- MOREIRA-FILHO, C.A.; WACHTEL, S.S. Study of H-Y antigen in abnormal sex determination with monoclonal antibody and an ELISA. *Am. J. Med. Genet.*, v.20, p.525-534, 1985.
- NICHOLAS, F.W.; SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.*, v.36, p.341-353, 1983.
- RAMALHO, M.F.P.D.-T.; GARCIA, J.M.; ESPER, C.R. et al. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer H-Y antisera. *Theriogenology*, v.62, p.1569-1576, 2004.
- RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, v.56, p.1-16, 2001.
- SHALEV, A.; BERCZI, I.; HAMERTON, J.L. The H-Y antigen production of antibodies, detection and cross-reaction between mouse, rat and human. *Cytogenet. Cell. Genet.*, v.22, p.672-675, 1978.
- SCHWERIN, M.; BLOTTNER, S.; THOMSEN, D. et al. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.30, p.39-43, 1991.
- TANAKA, T.; EBATA, T.; TAJIMA, A. et al. Beta2-Microbulin required for cell surface expression of blastocyst MHC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.332, p.311-317, 2005.
- UTSUMI, K.; HAYASHI, M.; TAKAKURA, R. et al. Embryo Sex selection by a rat male-specific antibody and cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.34, p.25-32, 1993.
- UTSUMI K.; IRITANI A. Characteristics of an anti-testis antibody effective in sexing rat embryos. *Theriogenology*, v.26, p.206, 1986.
- VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T. et al. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v.52, p.939-948, 1999.
- VAN VLECK, L.D.; POLLAK, E.J., BRANDFORD OLTENACU, E.A. *Genetics for the animal science*. Stoneham: W.H. Freeman, 1987. cap. 13, p.287-313.
- WRIGHT, R.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro production preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.44, p.1167-1189, 1995.