

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES
PRODUZIDOS *IN VITRO* POR ANTICORPOS ANTI H-Y
EM BOVINOS

Max Vitória Resende
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES
PRODUZIDOS *IN VITRO* POR ANTICORPOS ANTI H-Y
EM BOVINOS

Max Vitória Resende

**Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de
Lima**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2004

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Max Vitória Resende - nascido em 22 de Julho de 1976, na cidade de Salvador-BA. Em agosto de 2001 apresentou trabalho de graduação intitulado “Aspectos atuais da pré-seleção do sexo através da sexagem de espermatozóides em bovinos”, Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia - Salvador-BA em Setembro de 2001. Iniciou em Março de 2002 o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

"A ciência não é uma ilusão; ilusão seria imaginar que se pudesse buscar em outra fonte o que ela nos proporciona."

Freud

"Passamos a amar não quando encontramos uma pessoa perfeita mas quando aprendemos a ver perfeitamente uma pessoa imperfeita."

San Kenn

DEDICO

A minha noiva Adriana, que sempre acreditou em mim e me deu forças, carinho e amor, estando presente em todos os momentos e que, continuamente, vem tentando me transformar em uma pessoa melhor; tenho muito que agradecer a esta pessoa maravilhosa. E não poderia deixar de agradecer a seus pais que também são meus padrinhos (José e Conceição) pelo carinho, conselhos e ajuda sem restrições durante a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, por iluminar o meu caminho, dando-me força e saúde para continuar em frente;

Aos meus pais, José Resende e Maria Isis Vitória Resende pelo auxílio durante a minha caminhada acadêmica;

A Profa. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima pela valiosa orientação e por ter aceitado-me desde o estágio curricular e posteriormente para realização do mestrado e agora do doutorado;

Aos membros da banca examinadora Prof. Joaquim Mansano Garcia e a Profa. Cláudia Lima Verde Leal pelas excelentes sugestões a este trabalho;

Ao Prof. César Roberto Esper, pelas sugestões na qualificação e por estar sempre disponível aos questionamentos;

A Dra. Mariney Flávia Pereira Di-Tanno Ramalho por ter ensinado-me as técnicas e por ter contribuído muito para a realização deste trabalho;

Ao amigo de todas as horas, Rodrigo de Oliveira Vieira pelos anos de convivência e grande amizade;

A Maria Aparecida Dias Tostes (Cidinha) e Rodrigo Roberto Figueira, pelo apoio e carinho aqui em Jaboticabal;

Aos amigos e colegas da minha querida terra (Salvador-BA), pelos anos maravilhosos de convivência e amizade, em especial a Leandro Oliveira de Almeida e Luciano Oliveira de Almeida (cunhados), Cristiane Garboggini Melo, Maria Cleydi Milanezi, Marcos Jesuíno Lima Nogueira, Thaís Costa Marques;

Aos professores da Escola de Medicina Veterinária – UFBA pelos conhecimentos transmitidos ao longo dos anos e aos funcionários pelo carinho e atenção, em especial a Sra. Luzia Ferreira dos Santos (Dona Luzia) e Maria Celeste Viana, pelos seus conselhos e preocupações em relação a minha vida pessoal e profissional;

Aos colegas da pós-graduação: Alexandre Wolf, Christina Ramires Ferreira, Felipe Perecin, Gabriel Ferreira Soria, Ivo Walter dos Santos, Karina Beloti Avelino, Lorivaldo Paz Landim Junior, Sandra Helena Gabaldi, Simone Méo, por estarem sempre disposto a ajudar; e aos colegas que não citei fica aqui o meu agradecimento;

Ao amigo e colega Marcelo Zoccolaro Costa, pelo apoio e por sempre oferecer auxílio nos momentos difíceis deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Isabel Aparecida Penariol Natarelli, Ivo Luiz de Almeida Junior, Paulo Sérgio da Silva e em especial a Roberta Vantini por grande ajuda durante a execução da produção *in vitro* de embriões;

A Dra. Maria Notomi Sato da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo por ter cedido, gentilmente, os ratos isogênicos;

A Profa. Rosângela Zacarias Machado e a Rosângela Yamazaki Andrade (Toti) do Departamento de Patologia Veterinária - FCAV pelo auxílio na leitura das placas de ELISA;

Aos estagiários pelo auxílio na execução dos experimentos;

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado no período de outubro/2002 a fevereiro/2003, e ao CNPq durante o período de março/2003 a fevereiro de 2004.

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	v
Resumo	vii
Summary	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 – Importância da seleção do sexo na produção animal	04
2.2 – Genética da determinação primária do sexo	05
2.3 – Rotas tecnológicas para seleção do sexo em mamíferos	07
2.3.1 – Métodos invasivos de sexagem de embriões.....	07
2.3.2 – Métodos não invasivos (imunológicos) de sexagem de embriões.....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – Produção de anticorpos anti H-Y	13
3.2 – Cultivo de células TM-4	17
3.3 – Titulação dos anticorpos anti H-Y pelo ELISA	18
3.4 – Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	20
3.5 – Inibição do desenvolvimento embrionário por anticorpos anti H-Y	21
3.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
3.7 – Análise estatística	23

4. RESULTADOS	24
4.1 – Produção de anticorpos anti H-Y	24
4.2 – Identificação do sexo por inibição do desenvolvimento embrionário	30
4.3 – Verificação do sexo por reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
5. DISCUSSÃO	35
5.1 – Produção de anticorpos anti H-Y	35
5.2 – Identificação do sexo por inibição do desenvolvimento embrionário	36
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8. APÊNDICES	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina Sérica Bovina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA – Ensaio de imunabsorbância ligado à enzima

FIV – Fecundação *in vitro*

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

H-Y – Antígeno de histocompatibilidade macho-específico

IVPE – Injeção por via parênquima esplênico

IP – Intraperitoneal

NAR - Nagaze Analbuminemia Rat

PBS – Solução tamponada fosfatada

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

SFB – Soro fetal bovino

TBE – TRIS (Hidroximetil Amino Metano), Ácido Bórico e EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Resumo da produção de anticorpos anti H ₂ Y na família A de ratas isogênicas da linhagem Wistar Furth	25
Tabela 2 - Resumo da produção de anticorpos anti H ₂ Y na família B de ratas isogênicas da linhagem Wistar Furth	25
Tabela 3 - Resumo da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos cultivados na presença de anticorpos anti H ₂ Y, com total de mórulas (inibidas por anticorpos anti H ₂ Y), total de blastocistos (não inibidos por anticorpos anti H ₂ Y), a proporção sexual prevista (%) e o com o total de embriões produzidos nas repetições e o desvio padrão	31
Tabela 4 - Resultados obtidos após a sexagem de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> por inibição do desenvolvimento embrionário, embriões do grupo controle e confirmação dos resultados por PCR	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Sequência para obtenção de leucócitos extraídos do baço de rato	15
Figura 2 - Sequência para injeção de leucócitos por via parênquima esplênico em rata da linhagem Wistar Furth	16
Figura 3 - Montagem seqüencial para titulação de anticorpos anti H-Y pelo ELISA, utilizando-se como fonte de antígeno H-Y o sobrenadante de células TM-4	19
Figura 4 – Foto de uma placa de microtitulação após a realização de todos os passos de titulação dos anticorpos anti H-Y pelo ELISA	26
Figura 5 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 01 a 05, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	27
Figura 6 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 06 a 10, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	27
Figura 7 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 11 a 15, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	28
Figura 8 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 16 a 20, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	28
Figura 9 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 02 a 03, submetidos à descongelação e congelação, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	29
Figura 10 - Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 03, 12, 14 e 15, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo	30

- Figura 11 - Representação da porcentagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* em três repetições, que ficaram inibidos 24 horas após o cultivo com anticorpos anti H-Y (mórulas) e embriões que continuaram a se desenvolver (blastocistos)..... 31
- Figura 12 - Embriões em estágio de blastocisto e blastocisto inicial, 24 horas após o cultivo com meio contendo anticorpos anti H-Y, que não sofreram inibição do desenvolvimento e classificados com fêmeas 32
- Figura 13 - Embriões em estágio de mórula, após 24 horas de cultivo com meio contendo anticorpos anti H-Y, que sofreram inibição do desenvolvimento e classificados com machos 32
- Figura 14 - Gel de agarose dos padrões de amplificação por PCR de DNA de embriões bovinos produzidos *in vitro* corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos com 280bp, 210bp e 250bp 34

INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* POR ANTICORPOS ANTI H-Y EM BOVINOS

RESUMO - Anticorpos anti H-Y foram produzidos em ratas da linhagem isogênica Wistar Furth, e utilizados no sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, com o objetivo de desviar a proporção sexual. As ratas foram imunizadas com leucócitos do baço de machos de mesma linhagem, e a atividade biológica dos anticorpos verificada por ELISA. Cento e trinta e quatro embriões foram produzidos *in vitro* e quando atingiram o estágio de mórula foram incubados em meio de cultivo contendo 5% de anticorpos anti H-Y a 38,5 °C com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, por um período de 24 horas. Os embriões do grupo controle foram cultivados nas mesmas condições, sem adição de anticorpos anti H-Y. Após o cultivo com anticorpos anti H-Y, os embriões foram classificados em dois grupos: 1) embriões inibidos que permaneceram no estágio de mórula (classificados como machos) e 2) embriões que se desenvolveram e houve a formação de blastocle (classificados como fêmeas). Conseguimos produzir anticorpos anti H-Y com títulos de até 1:2048. Dos 134 embriões produzidos, 79 embriões (58,96%) tiveram o desenvolvimento inibido, e 55 embriões (41,04%) não sofreram inibição. O sexo de 124 embriões pode ser verificado com a PCR para confirmação dos resultados. Das 78 mórulas, 49 (62,82%) eram do sexo masculino e dos 46 blastocistos, 22 (47,83%) eram do sexo feminino. No grupo controle a proporção sexual foi de 55,57% de embriões fêmeas e 44,43% de embriões machos, totalizando 70 embriões. O teste do Qui-quadrado indicou que somente na sexagem de mórulas obteve-se desvio da proporção sexual (P<0,05) em relação ao grupo controle. Os resultados da sexagem foram diferentes dos apresentados na literatura o que pode ser devido à qualidade morfológica inferior dos embriões produzidos *in vitro* comparada aos embriões produzidos *in vivo*, ou também, a influência do meio de cultivo.

Palavras-chave: Anticorpos anti H-Y, desvio da proporção sexual, embriões bovinos, PCR

SEXING OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO BY DEVELOPMENT ARREST INDUCED BY ANTI-H-Y ANTIBODIES

SUMMARY - Anti-H-Y antibodies were produced in female rats of the isogenic strain Wistar Furth, immunized with spleen leukocytes of males of the same strain, and the biological activity of the antibody was verified by ELISA. One hundred and thirty four embryos were produced in vitro and when they reached the morula stage they were incubated with anti-H-Y antibodies at 38.5°C under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂, for a period 24 hours. The embryos in the control group were cultured under same conditions, without addition of the anti-H-Y antibodies. After culture of the embryos in the medium containing anti H-Y antibodies, they were classified in two groups: 1) arrested embryos that remained in morula stage (classified as male) and 2) embryos that developed and formed a blastocoele (classified as female). With the isogenic rats used, had been antibodies were obtained with titers up to 1:2048. Of the 124 embryos, 79 of them (58.96%) were arrested, and 55 embryos (41.04%) were not. The sex of 124 embryos was identified by PCR. Of the 78 morulas, 49 (62.82%) were confirmed as being male sex and of the 46 blastocysts, 22 (47.83%) were confirmed as being of the female sex. In the control group the sexual ratio was of 55.57% of female embryos and 44.43% of male embryos, totalizing 70 embryos. Using the Chi-Square Test it was possible to observe that in the sexing of morulas it was obtained only statistical difference ($P < 0.05$) in relation to the sexual ratio of the control group, while for sexed blastocysts no statistical difference was detected. The different results found compared with those reported in the literature could be due to the poor morphological quality of the in vitro produced embryos when compared with the in vivo produced ones, or also, to the influence of the culture medium used during the in vitro production of embryos with anti-H-Y antibodies.

Keywords: Anti-H-Y antibodies, sex ratio deviation, bovine embryos, PCR

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético animal beneficia-se, em um programa de seleção adequado, da superovulação e da transferência de embriões. A sexagem de embriões deve incrementar a aceleração do melhoramento genético animal, pois otimizará o progresso genético anual (VAN VLECK *et al.*, 1987).

Atualmente, os programas de transferência de embriões e testes de progênie, no contexto da produção animal, incluem, em escala crescente, a produção *in vitro* de embriões. A aplicabilidade da sexagem de embriões depende da sua conciliação com esta técnica. Os “produtos” desta técnica serão embriões produzidos *in vitro* e sexados que, após a transferência, permitam índices de prenhez significativos (acima de 60 %).

A sexagem de embriões de mamíferos é feita em programas de melhoramento ou produção animal, pelos métodos invasivos: a) análise citogenética, que permite a visualização do par de cromossomos sexuais; b) marcação do cromossomo Y com sondas de DNA específicas do cromossomo Y (ALVES *et al.*, 2003) e métodos não invasivos; c) detecção sorológica de um antígeno de membrana macho-específico - o antígeno H-Y (histocompatibilidade Y) por citotoxicidade, imunofluorescência indireta e inibição do desenvolvimento embrionário. Apesar de atingir-se quase 100% de acerto na identificação do sexo, a aplicação dos métodos invasivos tornou-se limitada devido a: a) sua característica invasiva que pode acarretar a diminuição do índice de prenhez; b) necessidade de cuidados especiais na manipulação no que diz respeito à retirada da biópsia e preparação da mesma para análise citogenética ou PCR, além disso, devido a precauções sanitárias, os embriões sexados por estes métodos não podem ser comercializados internacionalmente já que ocorre o rompimento da zona pelúcida durante a retirada das células. Os métodos imunológicos parecem ser mais vantajosos em

relação aos demais, devido a: a) não serem invasivos; b) serem de baixo custo; c) serem de fácil interpretação dos resultados. Além disso, permitiriam a comercialização internacional de embriões sexados por este método, já que não tem a zona pelúcida rompida (como na PCR), por está baseada na diferença do desenvolvimento entre os machos e fêmeas.

Os principais benefícios da seleção do sexo na produção animal são os seguintes: a) maximização do progresso genético anual com o conseqüente incremento dos índices de produção de leite ou carne. Estima-se que o aumento na produção de leite pode ser de até 25% (VAN VLECK *et al.*, 1987) e o ganho de peso pode ser incrementado em cerca de 29% (YOUNGS *et al.*, 1986) em relação aos métodos convencionais que não utilizam a seleção do sexo associada aos programas de transferência de embriões; b) a redução de até 33% no custo dos programas de teste de progênie e transferência de embriões (NICHOLAS & SMITH, 1983); c) maximização do retorno econômico tornando os sistemas de produção flexíveis em relação ao mercado. Por exemplo, pela transferência de embriões do sexo masculino de raças bovinas produtoras de carne para matrizes de raças produtoras de leite. Outro exemplo seria a transferência de embriões do sexo masculino de raças ovinas produtoras de carne em fêmeas de raças produtoras de lã. Com a aplicação destes esquemas, há possibilidade de ganho duplo para o produtor tanto na produção leiteira (bovinos) ou de lã (ovinos) como também no nascimento de uma progênie do sexo masculino na qual seria aproveitado para a produção de carne (SMITH, 1988).

Na última década, a produção de embriões bovinos tem sido utilizada em escala crescente, em programas de melhoramento animal. Alguns estudos demonstraram uma associação entre substâncias presentes no meio de cultivo com a proporção sexual e as taxas de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. Dentre os componentes que podem influenciar estas taxas está o soro fetal bovino e a glicose. Meios de cultivo com esses componentes favorecem o desenvolvimento mais rápido dos embriões machos que são mais estimulados por estes componentes do que os embriões fêmeas. (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996; GUTIÉRREZ-ADÁN *et al.*, 2001; PEIPPO *et al.*, 2001).

RAMALHO (1999), utilizou anticorpos anti H-Y para sexagem de 210 embriões murinos produzidos *in vivo*. Aproximadamente 43% tiveram seu desenvolvimento interrompido e foram classificados como machos. Destes, 83,5% eram do sexo masculino de acordo com análise citogenética ou PCR. Aproximadamente 57% dos embriões desenvolveram-se normalmente e foram classificados como do sexo feminino, 82,4% deles confirmados deste sexo pela análise citogenética ou PCR. Recentemente, obteve-se uma acuidade de 83% na sexagem de mórulas e 81,82% de blastocitos cultivados em meio de cultivo contendo anticorpos H-Y, em embriões produzidos *in vitro* de bovinos e murinos (RAMALHO *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como objetivos: a) produzir em linhagem de isogênica de ratos Wistar Furth, anticorpos anti H-Y, b) desenvolver um sistema de cultivo para inibição do desenvolvimento embrionário, utilizando anticorpos anti H-Y, na tentativa de desviar a proporção sexual durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, b) verificar a acuidade de identificação do sexo, utilizando a técnica de sexagem por um método de biologia molecular (PCR).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da seleção do sexo na produção animal

A possibilidade da seleção do sexo sempre despertou grande interesse dos produtores e da indústria animal. A seleção do sexo pode contribuir para aumentar o ganho dos produtores de carne e de leite obtendo-se progênie do sexo desejado de acordo com a demanda da produção comercial, e, além disso, pode-se utilizar a seleção do sexo para a reposição de novilhas no rebanho, expansão do rebanho, ou aumento da venda de machos para o abate (FABER *et al.*, 2003).

Em programas de seleção, o progresso genético anual, é maximizado quando se associa às técnicas de transferência de embriões, a produção *in vitro* de embriões, a clonagem e a seleção do sexo em embriões.

NICHOLAS & SMITH (1983) demonstraram que a seleção do sexo é particularmente importante para reduzir em até 33% o custo do teste de progênie, efetuado em sistemas de criação. Este sistema aplica a transferência de embriões (MOET do inglês “multiple ovulation and embryo transfer”) para reduzir o intervalo entre gerações, aumentar a intensidade de seleção e, conseqüentemente, maximizar o ganho genético.

TAYLOR *et al.* (1985) demonstraram que em um sistema de produção de carne, a máxima eficiência é alcançada quando a matriz é abatida logo após a desmama do primeiro produto (“once-bred heifer system”). As razões são as seguintes: a) nesta idade a fêmea assume o papel do produto no abate, o que minimizará o custo de produção do bezerro; b) quanto maior o número de partições menor a conversão alimentar da fêmea. Este sistema requer que toda novilha, antes do abate, desmame uma bezerra que a

reporá no rebanho. Com o controle do sexo, por sexagem do sêmen ou de embriões, cada matriz poderá produzir uma ou várias bezerras (“single-sex bread-heifer system”) e então, ser abatida.

Com base nessas considerações, VAN VLECK *et al.* (1987) compararam quatro programas de criação para a produção de leite e demonstraram que o ganho genético é maximizado naqueles em que o sexo pode ser selecionado, obtendo-se machos ou fêmeas, quando desejado.

2.2. Genética da determinação primária do sexo

A determinação do sexo, nos mamíferos, pode ser considerada como uma série de etapas ordenadas que se inicia com o estabelecimento do sexo genético, quando o oócito é fecundado por um espermatozóide portador do cromossomo X ou do cromossomo Y, originando, respectivamente, um embrião geneticamente feminino (XX) ou masculino (XY). O sexo genético determina que a gônada indiferenciada se organize como testículo ou ovário (sexo gonadal). A partir da diferenciação gonadal e do seu funcionamento endócrino, estabelece-se o sexo fenotípico (JOST, 1970).

A determinação primária do sexo é, portanto, a tradução do sexo genético em sexo gonadal, sendo importante caracterizar quais genes e moléculas estão envolvidos na determinação primária do sexo nos mamíferos.

O antígeno H-Y foi descoberto quando se transplantou um fragmento de pele de um camundongo isogênico macho para uma fêmea da mesma linhagem, ocorrendo rejeição do fragmento transplantado, o que não ocorria quando o transplante era feito de um macho para outro macho, de uma fêmea para outra fêmea ou da fêmea para um macho (EICHWALD & SILMSER, 1955). A presença do antígeno H-Y na superfície da membrana celular depende da associação com a beta-2-microglobulina ($\beta 2m$), um polipeptídeo de peso molecular em torno de 12.000 daltons. Nas células gonadais (XX ou XY) a ligação do H-Y é mediada por um receptor específico, já que a remoção imunológica da $\beta 2m$, presente na membrana plasmática dessas células, não impede a ligação do antígeno (ARNHOLD *et al.*, 1988).

Como o antígeno H-Y está presente somente nas células masculinas dos mamíferos, este é classificado como um epítipo antigênico macho-específico, pertencendo ao grupo de antígenos de histocompatibilidade secundária, e está localizado no cromossomo Y (SIMPSON *et al.*, 1997; MURAMATSU *et al.*, 2003).

O antígeno H-Y tem sido ligado a vários eventos imunológicos que incluem a rejeição de enxertos, citólise mediada por células T e antisoro de citotoxicidade. O anticorpo anti H-Y detecta o antígeno ligado à membrana e que está associado com a β 2-microglobulina, que é uma proteína solúvel secretada pelas células de Sertoli. Existe evidência de que em mamíferos, o antígeno H-Y pode ser idêntico ao hormônio anti-Mulleriano. Originalmente, acreditava-se que o antígeno H-Y era responsável pela determinação sexual, deste modo representando o fator determinante de testículos (TDF) em mamíferos, mas esta hipótese foi contestada por demonstrações de que a diferenciação gonadal também poderia ocorrer (no rato) na ausência do antígeno H-Y (WOLF, 1998).

Foram identificados, em murinos, dois genes ligados ao cromossomo Y que codificam para epítopos do antígeno H-Y, o gene "SMCY" codificando o H-2K^k e H-2D^k enquanto que o gene "Uty" codificando H-2D^b. Em humanos, foi demonstrado, recentemente, que o antígeno H-Y é codificado em mais de um "locus", e não em apenas em um como se conhecia anteriormente. Além do gene "SMCY" (codificando HLA-A2 e HLA-B7), o gene "Uty" (codificando HLA-B8) também codifica para epítopos do antígeno H-Y (WARREN *et al.*, 2000; SIMPSON, 2001).

A detecção do antígeno H-Y nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário permitiram a aplicação de métodos imunológicos para a sexagem de embriões de mamíferos (WACHTEL, 1983).

2.3. Rotas tecnológicas para a seleção do sexo em mamíferos

Duas rotas tecnológicas são percorridas na tentativa de selecionar-se o sexo em mamíferos, principalmente nas espécies de interesse zootécnico: seleção do sexo em espermatozoides (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 2000; SEIDEL Jr., 2003) e a identificação do sexo em embriões (RAMALHO *et al.*, 2000; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2000). No caso da sexagem de embriões bovinos, por exemplo, o mercado potencial é atrativo considerando-se que o Brasil é o segundo país, juntamente com o Japão, quanto ao número de transferências de embriões, atrás apenas dos Estados Unidos. Estima-se que em 2003 foram transferidos, no Brasil, cerca de 130 mil embriões (Fonte: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões), nos Estados Unidos foram 230 mil embriões transferidos. Na América Latina, o Brasil é líder absoluto com 90% das transferências de embriões bovinos. Associada à transferência de embriões, a FIV desponta como uma nova biotecnologia, com mercado em crescimento. Em 2003, foram 40 mil transferências com embriões produzidos *in vitro*, deixando o país em primeiro lugar no mundo (Fonte: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões). De 1992 a 2003 houve um aumento de 1000% nas transferências de embriões no nosso país, passando de 14 mil para 130 mil por ano. Além das vantagens zootécnicas, a utilização das tecnologias propostas, até o momento, para seleção do sexo em embriões, depende do desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo, e que não necessitem de laboratórios com condições controladas e técnicos especializados para executá-las.

2.3.1 Métodos invasivos de sexagem de embriões

a) Citogenético

Em 1994, HOSSEPIAN DE LIMA e colaboradores realizaram análise citogenética de embriões murinos e bovinos. Mórulas compactas e blastocistos iniciais foram cultivados em meio de cultivo complementado. Como mitostático, para sincronização do ciclo celular, foram usados colchicina ou FdU-timidina-colchicina para a sincronização do ciclo celular. O tempo de exposição a colchicina variou de 2 a 8 horas, e os melhores

índices de sincronização do ciclo celular (88,89% e 83,33%) foram obtidos com 8-10 horas de colchicinização, em murinos e bovinos, respectivamente. Com a utilização de FdU-timidina-colchicina, obteve-se um acerto na sexagem de 88,89% e 90% em embriões murinos e bovinos produzidos *in vivo*, respectivamente.

GARCIA (1993) sexou embriões murinos e suínos por análise citogenética, utilizando demecolcine, como mitostático. De um total de 619 embriões murinos analisados, 435 foram sexados, 70,27% em relação ao número total de embriões fixados, e 81,31% em relação aos embriões que apresentaram metáfase. Já na análise cariotípica de hemi-embriões suínos, identificou o sexo em 44 de 168 hemi-embriões 26,19% em relação ao número de embriões fixados e 36,36% em relação aos embriões que apresentaram metáfase.

b) Métodos de Biologia Molecular

Com o avanço nos estudos de mapeamento do cromossomo Y (GOODFELLOW *et al.*, 1987), descobriram seqüências de DNA específicas do cromossomo Y que são aplicadas para a sexagem de embriões (COTINOT *et al.*, 1991). Utilizam-se as técnicas de hibridização *in situ* (KIRSZENBAUM *et al.*, 1990) ou PCR (HERR *et al.*, 1990b; PEURA *et al.*, 1991; BREDBACKA *et al.*, 1995). Em bovinos, na biópsia da massa celular são retiradas células por micromanipulação no sétimo dia de desenvolvimento embrionário.

A presença ou ausência de amplificação da seqüência macho-específica, verificada pelo padrão de bandas produzido em gel de agarose, indica o sexo do embrião. A viabilidade deste método foi primeiramente demonstrada em humanos (HANDYSIDE *et al.*, 1989) e, posteriormente, em embriões bovinos *Bos taurus* (HERR *et al.*, 1990a; PEURA *et al.*, 1991; BREDBACKA *et al.*, 1995). Obteve-se uma acuidade em torno de 99% na identificação do sexo. Entretanto, o risco de contaminação das amostras com DNA exógeno de outros animais machos e, conseqüente obtenção de falsos positivos, dificulta a utilização desta técnica nos programas de transferência de embriões a campo.

A principal limitação para utilização de métodos invasivos é que os embriões sexados não podem ser comercializados internacionalmente, devido a precauções sanitárias, já que ocorre o rompimento da zona pelúcida durante a retirada das células. Este é um dos motivos pelo os quais alguns grupos tentam desenvolver métodos não invasivos para a sexagem de embriões (HOSSEPIAN DE LIMA, 1993; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2000; RAMALHO *et al.*, 2000)

2.3.2 Métodos não invasivos (imunológicos) de sexagem de embriões

a) Citotoxicidade

Este método baseia-se no cultivo dos embriões em meio de cultivo quimicamente definido, contendo anticorpos anti H-Y e uma fonte de complemento. Cerca de 50% dos embriões nos estádios de 16 células a blastocisto, submetidos a este tratamento, sofreram sua ação citolítica, caracterizada pela lise total ou parcial dos blastômeros e foram classificados do sexo masculino.

Cerca de 85% dos embriões que não sofreram citólise, confirmaram ser do sexo feminino em murinos (WHITE *et al.*, 1982,1983; SHELTON & GOLDBERG, 1984) e em bovinos (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 1993).

Esta técnica foi substituída pela imunofluorescência indireta já que a eliminação dos embriões do sexo masculino é indesejável em alguns programas de melhoramento animal.

b) Imunofluorescência Indireta

Nesta técnica, utiliza-se um anticorpo fluorescente marcado contra os anticorpos anti H-Y e este conjugado é colocado no meio de cultivo dos embriões, que após 24 horas são analisados em um microscópio invertido com contraste de fase e fluorescência, sendo classificados como fluorescente (H-Y positivo) ou não fluorescente (H-Y negativo).

HOSSEPIAN DE LIMA *et al.* (1993), utilizando soro anti H-Y absorvido e anticorpo monoclonal anti H-Y gw-16, obtiveram um índice de acuidade de cerca de 86,88% e

88,09% na sexagem dos embriões murinos e bovinos, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos, não só em bovinos (WHITE *et al.* 1984,1987a; WACHTEL *et al.*, 1988), mas também em ovinos (WHITE *et al.*, 1987c), suínos (WHITE *et al.*, 1987b) e eqüinos (WOOD *et al.*, 1988).

MOREIRA-FILHO *et al.* (2000), em embriões de zebuínos brasileiros, selecionaram o sexo utilizando soro anti H-Y com alto título, produzido em ratas de linhagem isogênica NAR, imunizando-as com células esplênicas de macho de mesma linhagem. Após a classificação em microscópio, o sexo dos embriões foi determinado por PCR, conseguindo-se 82,14% de machos e 90,38% de fêmeas.

A imunofluorescência indireta tornou-se factível para a identificação do sexo porque além de preservar os embriões do sexo masculino, não é invasiva. Entretanto, requer a utilização de equipamentos de alto custo e técnicos com treinamento adequado, já que a fluorescência apresenta nuances que podem levar a uma identificação subjetiva do sexo.

c) Inibição do Desenvolvimento Embrionário

Em embriões machos de ratos, UTSUMI & IRITANI (1986), demonstraram que o cultivo com anticorpos anti H-Y inibia a formação da blastocele. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram produzidos em ratas isogênicas da linhagem Wistar (anticorpos policlonais), e também foram utilizados anticorpos monoclonais.

UTSUMI *et al.* (1993) conseguiram separar em dois grupos, pela sexagem embriões produzidos *in vivo* de camundongo, coelho, cabra, ovelha e de vaca, baseado na sua morfologia, quando estes foram incubados com anticorpos anti H-Y. Após o cultivo das mórulas com os anticorpos anti H-Y, metade dos embriões permaneceram no estágio de mórula e a outra metade desenvolveram-se até blastocisto. Na análise cromossômica, demonstrou-se que 80 a 90% dos embriões bovinos que não foram inibidos pelos anticorpos eram do sexo feminino e 80% dos embriões que tiveram seu desenvolvimento inibido eram do sexo masculino.

Em murinos, observou-se que em torno de 50% dos embriões, no estágio de mórula não se desenvolveram até blastocisto, quando cultivados em meio contendo anticorpos anti H-Y. Para a confirmação destes resultados, realizou-se análise citogenética dos embriões. Identificaram-se 84,2% de machos no grupo de embriões cujo desenvolvimento foi inibido em cultivo com anticorpos anti H-Y (GARCIA *et al.*, 1992; RAMALHO *et al.*, 2000).

Em embriões bovinos e murinos produzidos *in vivo*, RAMALHO *et al.* (2000), conseguiram uma acuidade de 83% na sexagem de mórulas tardias e 81,82% de blastocistos cultivados em meio de cultivo contendo anticorpos H-Y, sendo os mesmos transferidos para receptoras obtendo-se uma taxa de gestação de 71,43% para mórulas tardias e 68,75% para blastocistos. A verificação do sexo genético dos embriões foi realizada por análise citogenética ou PCR. Os anticorpos anti H-Y foram produzidos em linhagem isogênica de ratos NAR, utilizando-se 7 a 10% de soro contendo anticorpos no meio de cultivo dos embriões.

Apesar da causa da inibição do desenvolvimento embrionário não estar completamente elucidada, estudos anteriores sobre o antígeno H-Y (OHNO *et al.* 1978), reportaram o desnudamento ou “lysostripping” do antígeno H-Y da superfície das células testiculares. Com base neste estudo, pode-se sugerir que o desnudamento do antígeno H-Y das células embrionárias do sexo masculino seja um fator importante a ser considerado como causa da inibição do desenvolvimento embrionário, uma vez que este fenômeno implica em gasto energético por parte da célula, podendo ocasionar uma interrupção temporária na divisão celular do embrião (RAMALHO, 1999). O “lysostripping”, também conhecido como desnudamento, é uma técnica celular de remoção de um antígeno da superfície celular pela exposição das células portadoras a um anti-soro específico para esse antígeno (CULLEN *et al.*, 1973).

A fim de elucidar a causa da inibição do desenvolvimento de embriões machos na presença de anticorpos anti H-Y, UTSUMI *et al.* (1993) discutiram a contribuição das glicoproteínas como antígenos de superfície celular e seu papel primordial na compactação celular da mórula. Anticorpos anti antígenos F9, uma glicoproteína da superfície celular embrionária, inibem a compactação das mórulas de ambos os sexos

(OGOU *et al.*, 1982). Como o antígeno H-Y é uma proteína altamente glicosilada, UTSUMI *et al.* (1993) sugeriram que a ligação antígeno – anticorpo H-Y poderia possibilitar a compactação do embrião macho e, inibir a diferenciação para blastocisto. Porém, RAMALHO (1999) questionou, se o antígeno H-Y é tão importante na compactação celular, pois como explicar o fato dos embriões femininos compactarem normalmente, já que estes não possuíam antígeno H-Y na sua superfície celular.

Experimentos com embriões, marcando anticorpos anti H-Y com FITC foram realizados com objetivo de monitorar o padrão de fluorescência durante 24 horas e verificar se coincidia com o padrão de fluorescência observado no fenômeno do “lysostripping”. Aproximadamente 50% dos embriões apresentaram fluorescência após incubação com anticorpo anti H-Y. Após 90 minutos de incubação os embriões do sexo masculino apresentaram padrão de fluorescência específica conforme confirmado por foto. Após algum tempo, o padrão de fluorescência tornou-se gradativamente tênue, não apresentando mais fluorescência visível após 24 horas. Esta fluorescência não pode ser documentada por ser muito tênue e também pela limitação do equipamento de microscopia de fluorescência disponível. Portanto, embora o padrão de fluorescência observado indicasse a possibilidade de ocorrência do “lysostripping” em embriões machos incubados com anticorpos anti H-Y, vários experimentos falharam na tentativa de documentar fotograficamente o fenômeno do “lysostripping” nos embriões, provavelmente devido a resolução inadequado do microscópio de fluorescência utilizado, assim como o equipamento fotográfico acoplado (RAMALHO, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA) e no Departamento de Patologia Veterinária - FCAV - UNESP - Campus de Jaboticabal.

Consistiu nas seguintes etapas: produção dos anticorpos anti H-Y → titulação dos anticorpos (cultivo de células TM-4 e ELISA) → utilização dos anticorpos no cultivo *in vitro* de embriões bovinos → verificação do desvio da proporção sexual pela inibição do desenvolvimento embrionário → e confirmação do desvio da proporção sexual pela PCR.

3.1. Produção de anticorpos anti H-Y

A produção dos anticorpos anti H-Y seguiu a metodologia descrita por RAMALHO (1999), contudo foi utilizada a linhagem Wistar Furth, no presente trabalho, ao invés da linhagem NAR.

Foram utilizados machos e fêmeas (com idade entre 45 e 55 dias) da linhagem isogênica Wistar Furth divididos em duas famílias, denominadas de família A e família B, cedidos pelo Departamento de Imunologia e Alergia da Faculdade de Medicina – USP – São Paulo - SP. Os animais foram mantidos no Biotério do DMVPRA em caixas de polipropileno com dimensões de 41 x 34 x 16cm (comprimento x largura x altura) em temperatura ambiente em torno dos 25°C, com luminosidade controlada (14h) e com água e ração (própria para animais de laboratório) à vontade.

As células utilizadas para imunização das fêmeas de linhagem isogênica, foram leucócitos extraídos do baço de um macho da mesma linhagem. O macho doador do baço foi sacrificado com auxílio de éter sulfúrico. O baço foi retirado assepticamente e,

imediatamente, depositado em placa de petri estéril e encaminhado para a dissociação sob capela de fluxo laminar (Figura 1a). A dissociação foi realizada com auxílio de um dissociador de células (Dissociador de Thomas) em PBS + 5% SFB (Figura 1b e 1c). Procedeu-se a separação dos leucócitos por centrifugação em Histopaque 1077¹ a 620 x g por 30 minutos. Depois da recuperação dos leucócitos no halo, os mesmos foram centrifugados a 220 xg por três vezes em solução de PBS + 5% SFB para a total retirada do Histopaque (Figura 1d). Para a realização da contagem de leucócitos, uma alíquota foi retirada da suspensão, diluída a 1:200 numa solução de ácido acético a 4% e contados em uma câmara de Neubauer. O volume para imunização foi ajustado para uma concentração final de 4×10^7 leucócitos.

Para a injeção de leucócitos por via parênquima esplênico, as ratas foram anestesiadas com hidrocloreto de metomidato (Hypnodil²), na dosagem de 5 a 6 mg/rata. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm na região abdominal esquerda, paralela à última costela – Figura 2a a 2c. As ratas foram imunizadas por uma injeção via parênquima esplênico com 4×10^7 de leucócitos. Após a cirurgia suturou-se a ferida cirúrgica com três pontos simples separados em um só plano (peritônio, camada muscular, subcutâneo e pele), utilizando-se fio de nylon – Figura 2d. Depois de 18 dias efetuou-se um reforço via intraperitoneal com o mesmo número de leucócitos, e 10 dias após, sangrou-se as ratas por punção cardíaca, para a obtenção do soro anti H-Y.

¹ Sigma H-8889, Saint Louis, USA

² Lab. Janssen, New Jersey, USA

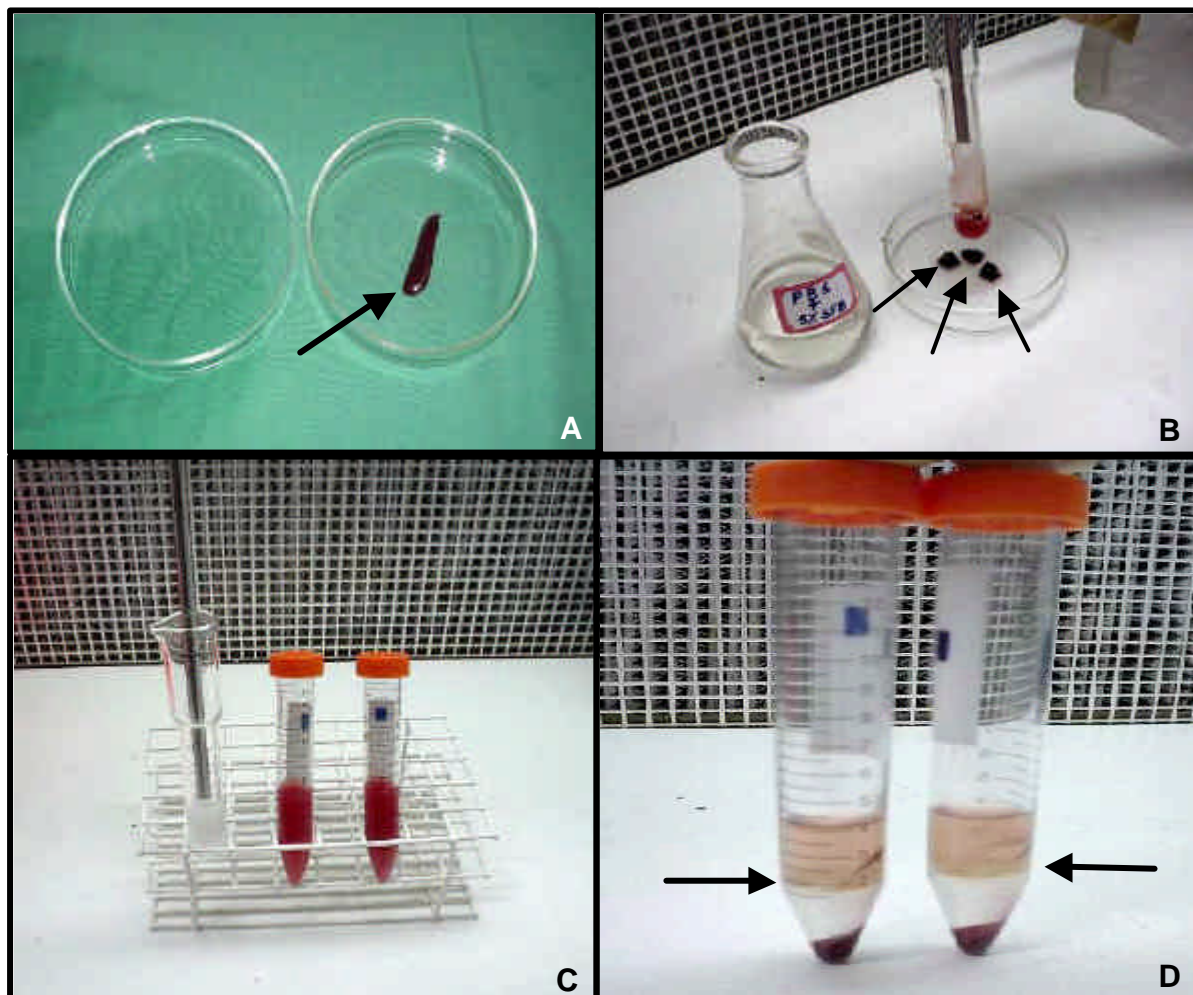


Figura 1: Sequência para obtenção de leucócitos extraídos do baço de rato. Legenda: **A**: baço (indicado por uma seta) de um rato com seis semanas de idade da linhagem Wistar Furth. **B e C**: Dissociação do baço com auxílio de um Dissociador de Thomas. **D**: Halo de leucócitos (indicado pelas setas) após a centrifugação em Histopaque 1077.

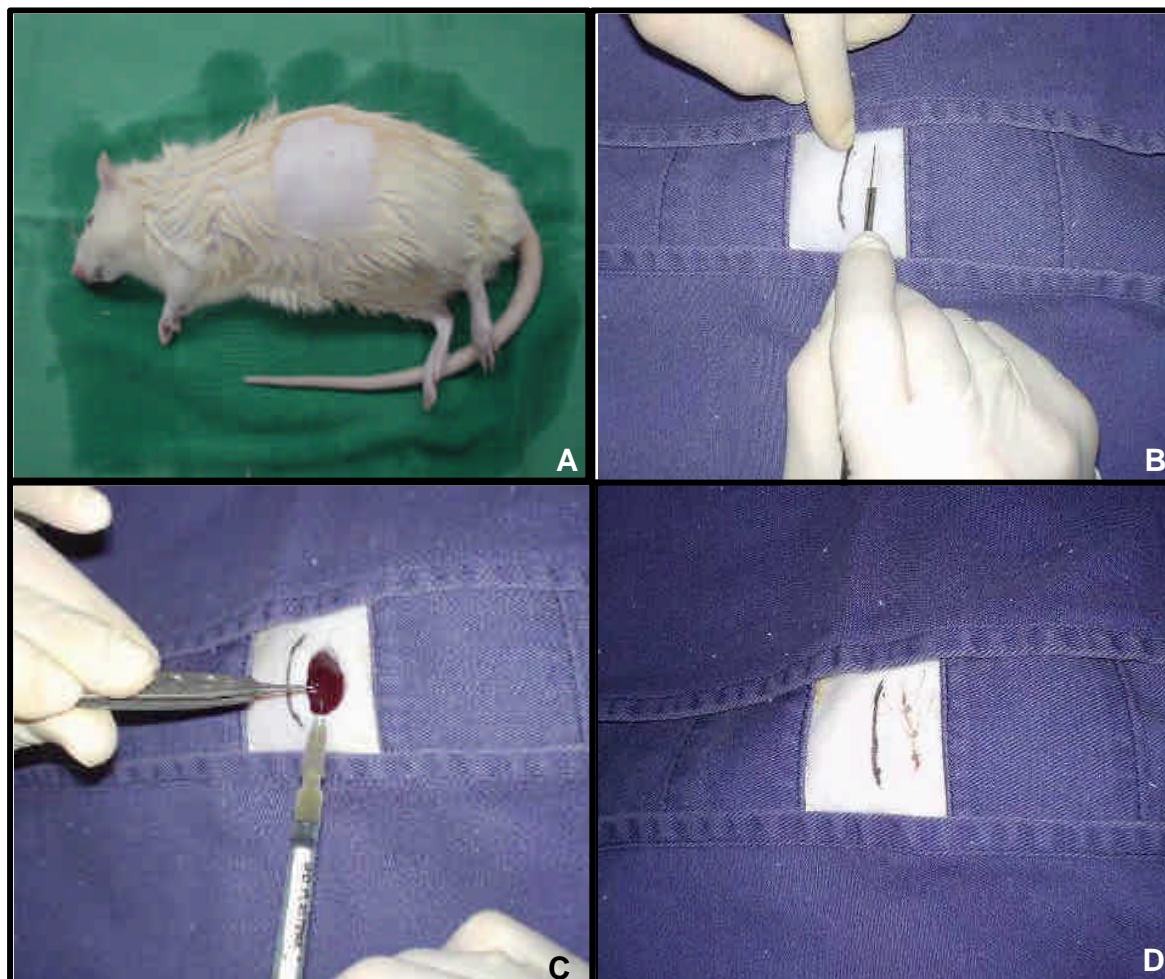


Figura 2: Sequência para injeção de leucócitos por via parênquima esplênico em rata da linhagem Wistar Furth. Legenda: **A**: rata anestesiada em decúbito lateral direito, com região tóraco-abdominal tricotomizada. **B**: início da incisão paralela à última costela – a costela foi demarcada para melhor visualização. **C**: injeção de leucócitos via parênquima esplênico. **D**: sutura em pontos simples separados

3.2 Cultivo de células TM-4

O sobrenadante de células TM-4 (Células tumorais de células de Sertoli de camundongos - secretoras de antígeno H-Y solúvel - BRUNNER *et al.*, 1984a) foi utilizado como fonte do antígeno H-Y para a titulação do anticorpo anti H-Y produzidos nas ratas.

As células TM-4 foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia Aplicada e Biotecnologia do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP – São Paulo – Brasil, sendo trazidas deste local por RAMALHO (1999), onde foram replicadas, congeladas e estocadas em nitrogênio líquido no DMVPRA – FCAV – UNESP – Jaboticabal. As células foram colocadas em meio de cultivo antes de estarem completamente descongeladas e lavadas três vezes por centrifugação a $140 \times g$ com objetivo de remover o Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para a congelação. Em seguida, as células TM-4 foram cultivadas em meio de cultivo contendo 50% de meio Ham's F12³ e 50% de meio DMEM⁴ acrescido de 5% de SFB e 50µl/mL de sulfato de amicacina (antibiótico). Cada microtubo de células congeladas deram origem a duas garrafas médias de cultivo. Depois de aproximadamente 24 horas de cultivo o meio foi trocado. Por volta de 24 horas após a troca do meio, as células foram tripsinizadas (tripsina a 0,25%) e transferidas para outras garrafas de cultivo. Quando as células aderiram ao fundo da garrafa, aproximadamente 24 horas depois da tripsinização, o meio de cultivo era trocado por um meio sem SFB e suplementado com 10µg/mL de insulina⁵ e 10µg/mL transferrina⁶. As células foram mantidas em cultivo por aproximadamente 48 horas, em seguida, o sobrenadante das células era colhido, filtrado e estocado a 80°C negativos. Todo cultivo ocorreu em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ em ar.

³ Gibco 27700-075 - Stoneham, USA

⁴ Gibco 125800-017 – Stoneham, USA

⁵ Sigma I-4011 - Saint Louis, USA

⁶ Gibco 680-3008AD - Stoneham, USA

3.3 Titulação dos anticorpos anti H-Y pelo ELISA

Com o intuito de verificar a atividade biológica do anticorpo anti H-Y produzidos nas ratas, foi realizado titulação pelo ELISA. A metodologia utilizada foi descrita por MOREIRA-FILHO & WACHTEL (1985).

Uma placa de poliestireno para microtitulação foi sensibilizada com 100 μ L do antígeno H-Y solúvel (sobrenadante de células TM-4) em cada poço, permanecendo a 4°C por 12 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS acrescido de 0,05% de BSA⁷ (pH 7,2), bloqueada com PBS contendo 3% de BSA (pH 7,2) por três horas a 37°C e lavada três vezes novamente. O anticorpo primário (anti H-Y) foi adicionado após diluição serial em PBS contendo 1% de BSA. Após incubação por 60 minutos em gelo picado, a placa foi novamente lavada por três vezes com PBS contendo 0,05% de BSA e adicionou-se, em cada poço, anticorpo anti-imunoglobulina de rato, conjugado com peroxidase⁸, diluído 1:3000 em PBS-BSA 1%. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos e foi lavada três vezes com PBS-BSA 0,05%. Os poços foram preenchidos com o substrato (1mg/mL de ortofenildiamina + 1 μ L/mL de peróxido de hidrogênio a 30% diluídos em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5) e mantidos sob agitação constante, no escuro, por 15 minutos. A reação foi interrompida com adição de 100 μ L de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da reação foi feita, imediatamente, em um leitor de absorvância⁹ com filtro de 490nm. Para a verificação de ligações inespecíficas e eficiência do bloqueio da placa de titulação, foram feitos os seguintes controles: sem antígeno, sem anticorpo primário e o soro negativo (soro de rata não submetida à imunização). Na Figura 3 estão ilustradas as etapas da adição dos reagentes para realização do ELISA. A preparação das substâncias para realização do ELISA encontra-se no Apêndice 1.

⁷ Sigma A-7030 - Saint Louis, USA

⁸ Goat Anti-Rat Ig (H + L) HRP Cat. n° 3010-05 - Southern Biot. Assoc., Alabama, USA

⁹ MRC-TC Plus – Dynex Technologies, Virginia, USA

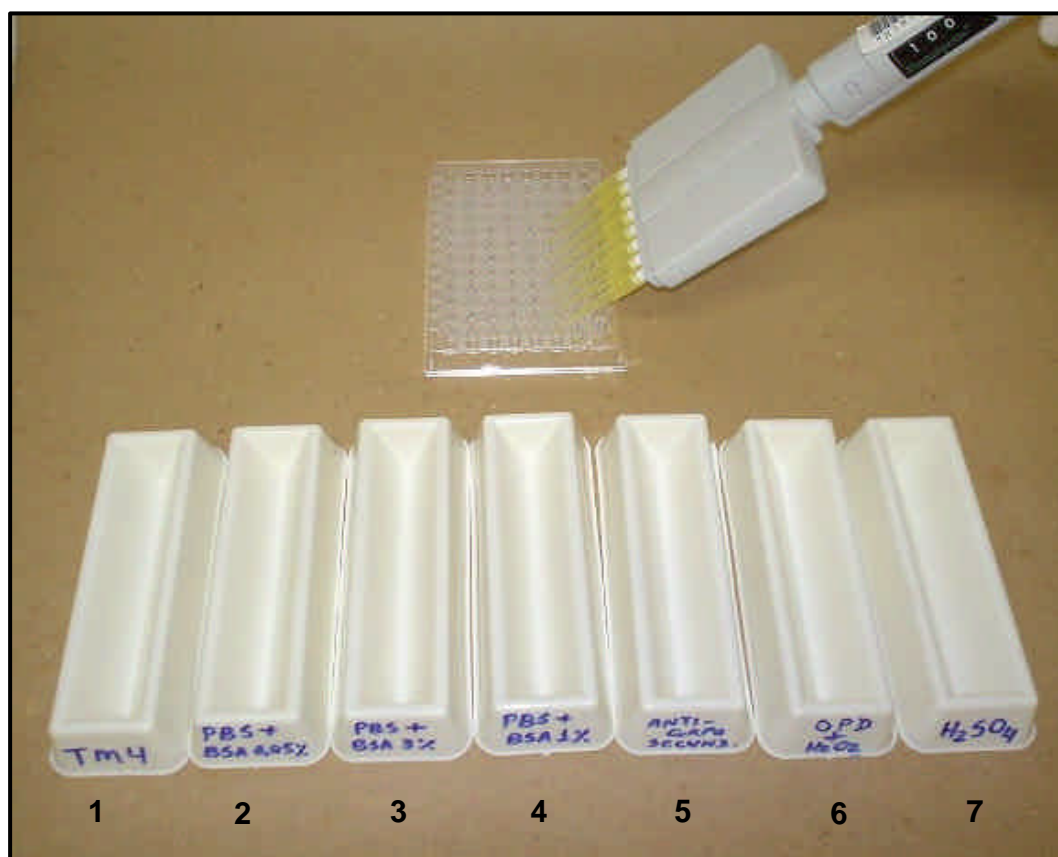


Figura 3: Montagem seqüencial para titulação de anticorpos anti H-Y pelo ELISA, utilizando-se como fonte de antígeno H-Y o sobrenadante de células TM-4. Legenda: (1): Antígeno H-Y, (2): PBS-BSA 0,05% - meio para lavagem da placa, que se intercala entre as etapas 1 a 5; (3): PBS-BSA 3% - bloqueio da placa; (4): PBS-BSA 1% - diluição do anticorpo primário; (5): Anticorpo secundário; (6): OPD + Peroxidase 30% - substrato da reação; (7): Ácido sulfúrico 4N – interrupção da reação.

3.4 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* de embriões bovinos, desde a maturação até a fecundação, seguiu os protocolos do Laboratório de Produção de Embriões do DMVPRA da FCAV - UNESP, e o cultivo *in vitro*, após 24h da fecundação, baseou-se nas informações de GUTIÉRREZ-ADÁN *et al.* (2001).

Os oócitos obtidos de ovários de matadouro, total e parcialmente revestidos com *cumulus* compacto foram lavados por duas vezes em meio de lavagem (Apêndice 2.1), e transferidos para microgotas de meio de maturação contendo TCM 199 suplementado com 10% SFB, 26,2mM de NaHCO₃, 100mM de piruvato de sódio, 16,67µg/µl de amicacina, 1µg/µl de FSH, 10U/mL de hCG e 0,001µg/µl de 17β estradiol (Apêndice 2.2). Foram cultivados durante 24 horas na atmosfera de 5% de CO₂ em ar, umidade relativa de 100% e temperatura de 38,5°C.

As doses de sêmen foram descongeladas a 35°C por 20 segundos, e o sêmen foi depositado sobre um gradiente de Percoll de duas fases (90 e 45%) à temperatura ambiente e centrifugado a 900 x g durante 30 minutos, a fim de sedimentar os espermatozoides viáveis.

Depois de preparado em microgotas de FIV, os espermatozoides (aproximadamente 100x10³/gota) foram incubados por 60 a 90 minutos para capacitação.

Os oócitos maturados por 24-25 horas foram lavados por três vezes em meio TCM-199 suplementado com 25mM de HEPES, 100mM de piruvato de sódio, 0,3% de BSA livre de ácidos graxos e uma vez no meio de FIV gotas (Apêndice 2.3). Em seguida, foram colocados para fecundação (aproximadamente vinte por gota de 90 µL) e incubados por 20 horas em 5% de CO₂, na temperatura de 38,5°C.

Após a fecundação, os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em meio SOF (fluido sintético de oviduto) sem SFB (Apêndice 2.4) e transferidos para placas com quatro poços contendo 500µl do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fecundação.

Foram cultivados em câmara incubadora modular¹⁰ em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂, 100% de umidade relativa e temperatura de 38,5 °C.

3.5 Inibição do desenvolvimento embrionário por anticorpos anti H-Y

Quando os embriões alcançaram o estágio de mórula, em aproximadamente cinco dias e meio após a fecundação, foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo foi adicionado ao meio de cultivo 5% de soro contendo anticorpos anti H-Y com título de 1:2048, e ao segundo grupo (controle) não houve adição de anticorpos. Os dois grupos foram cultivados por um período de 24 horas com temperatura de 38,5 °C em câmara incubadora modular em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂.

Considerando o desenvolvimento dos embriões após o cultivo com os anticorpos anti H-Y, estes foram classificados em dois grupos: 1) aquele cujos embriões tiveram o desenvolvimento inibido no estágio de mórula; 2) aquele cujos embriões desenvolveram-se durante o cultivo e houve a formação de blastocelo. Os embriões cujo desenvolvimento foi inibido durante o cultivo com anticorpos anti H-Y foram classificados como do sexo masculino; aqueles cujo desenvolvimento não foram afetado pelos anticorpos anti H-Y, foram classificados como do sexo feminino.

Após a separação dos embriões classificados como machos e classificados como fêmeas, foram lavados em PBS, colocados individualmente em microtubos de 0,2mL com parede fina e mergulhados em nitrogênio líquido para imediata congelação. Após estarem congelados, os microtubos foram retirados do nitrogênio líquido e mantidos em temperatura de 20°C negativos até o momento da PCR

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* foi identificado por PCR, utilizando-se dois pares de diferentes oligonucleotídeos iniciadores ("primers") que

¹⁰ Billups Rothenberg, California, USA

amplificam uma sequência específica do cromossomo Y, presente no DNA genômico de bovinos do sexo masculino (XY). Os dois pares de "primers" escolhidos para a sequência específica do cromossomo Y foram: "**Primer**" 1: 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'; "**Primer**" 2: 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG - 3' e 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T - 3'. O "primer" 1 amplifica uma sequência de 210 pb para DNA de machos bovinos (BONDIOLI *et al.*, 1989) e o "primer" 2 amplifica uma sequência de 250 pb em machos (SCHWERIN *et al.*, 1991).

Utilizou-se, também, um "primer" específico para o DNA bovino: "**Primer**" 3: 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'. Este "primer" amplifica uma sequência de 280 pb, repetida no genoma bovino (ELLIS & HARPOLD, 1986,1988; ELLIS *et al.*, 1988).

Antes da PCR, a cada tubo contendo um embrião, adicionou-se Proteinase K (5µg/embrião) (Apêndice 3.1) e incubou-se por 60 minutos, a 37°C utilizando um termociclador. Em seguida, a Proteinase K foi desnaturada a 98°C por 10 minutos. O conteúdo de cada tubo foi dividido em duas amostras (A e B) que, em seguida, foram submetidas a PCR.

As condições da reação foram as seguintes: tampão com 10mM Tris-HCl + 1mM de EDTA, pH 8; 2mM MgCl₂, 1U de Taq DNA Polimerase¹¹ e 2mM de dNTP. O volume total no de reação foi de 25 µL. Nos tubos contendo a **amostra A** foram adicionados 10 pmol do "**primer**" 1 e 10 pmol do "**primer**" 3. Naqueles contendo a **amostra B** foi adicionado 10 pmol do "**primer**" 2.

A amplificação foi efetuada em termociclador. As **amostras A** foram submetidas a 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C. As **amostras B** foram submetidas a 38 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de um período de 7 minutos a 72°C.

¹¹ AmpliTaq Gold - Applied Biosystem N808-0241, New Jersey, USA

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em uma cuba própria, com solução TBE 1X (Apêndices 4.2 a 4.3) em gel de 2% de agarose, corados com brometo de etídeo (10mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. Os embriões foram identificados como fêmeas somente quando o produto de 280 pb foi visualizado na amostra A e nenhuma outra banda foi visualizada na amostra B correspondente. A presença de duas bandas (280 e 210 pb) na amostra A indicou que o embrião era do sexo masculino. Este resultado foi confirmado somente quando uma banda de 250 pb foi visualizada na amostra B correspondente. Em todos os géis foram utilizados os controles: DNA de macho, DNA de fêmea e um negativo (branco) o qual não foi adicionado DNA. Também foi utilizado um marcador de peso molecular (“ladder”) ϕ X174 RF DNA / Hae III Fragments¹².

Os géis foram analisados utilizando-se equipamento de documentação fotográfica STRATAGENE (Eaglesight® “Software”).

3.7 Análise estatística

Com os resultados obtidos por PCR, o qual foi observado o sexo genético dos embriões produzidos *in vitro* e cultivados na presença de anticorpos anti H-Y (grupo tratamento), e sem a presença de anticorpos anti H-Y (grupo controle), realizou-se análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, ao nível de 5%, para verificar a acuidade na sexagem de mórulas (prováveis machos) e blastocistos (prováveis fêmeas) levando-se em consideração o desvio da proporção sexual do grupo controle. O teste do Qui-quadrado foi realizado em uma tabela 2x2, ou seja, mórulas comparando-se com o grupo controle e blastocistos comparando-se com o grupo controle.

¹² Invitrogen 15612-013 - Carlsbad, USA

4. RESULTADOS

4.1 – Produção de anticorpos anti H-Y

Um resumo com a idade com a qual as ratas foram imunizadas, o intervalo entre a sangria e a titulação de cada soro contendo anticorpos anti H-Y encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os soros de número 01 a 10 foram originados da família A e de número 11 a 20, da família B.

Na Figura 4 está representado um dos resultados da titulação de anticorpos anti H-Y pelo ELISA após a titulação do soro em placa de microtitulação. A diluição serial realizada nesta placa foi da coluna 1 até a coluna 8, o que correspondeu a uma diluição de 1:8 a 1:1024, ou, em alguns casos, 1:16 a 1:2048. Além dos soros testados (linhas D a H) estão também representados os controles da reação: sem antígeno, sem anticorpo primário e o negativo – soro de rata não submetida à imunização (linhas A a C, respectivamente)

Como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2, não houve influência do intervalo entre a produção e a titulação do anticorpo anti H-Y sobre o título do mesmo, pelo menos quando os soros foram estocados à temperatura de 80°C negativos, dentro do período testado de até 102 dias.

As curvas da atividade biológica, encontradas pela titulação dos anticorpos anti H-Y pelo ELISA, de todos os soros estão ilustradas nas Figuras 5 a 8. Nestas figuras estão presentes, além dos soros testados, os controles da reação que são: controle sem antígeno, controle sem anticorpo primário e o controle negativo (soro de rata não submetida à imunização). A leitura de corte foi determinada pelo valor médio de

absorbância do controle negativo, multiplicado pelo fator 2,5, sendo representada nos gráficos pela linha horizontal pontilhada.

Tabela 1: Resumo da produção de anticorpos anti H-Y na família A de ratas isogênicas da linhagem Wistar Furth.

Nº do Soro	Idade (em dias) da IVPE	Intervalo (em dias) entre a sangria e a titulação	Titulação
01	49	82	1:128
02	49	82	1:1024
03	49	102	1:2048
04	49	80	1:16
05	49	80	1:32
06	49	81	1:128
07	54	79	1:128
08	54	79	1:128
09	54	79	1:32
10	54	79	1:256

Tabela 2: Resumo da produção de anticorpos anti H-Y na família B de ratas isogênicas da linhagem Wistar Furth.

Nº do Soro	Idade (em dias) da IVPE	Intervalo (em dias) entre a sangria e a titulação	Titulação
11	54	91	1:1024
12	54	91	1:2048
13	54	91	1:512
14	55	95	1:2048
15	55	95	1:2048
16	55	91	1:1024
17	45	9	1:512
18	45	9	1:1024
19	46	6	1:512
20	46	6	1:256

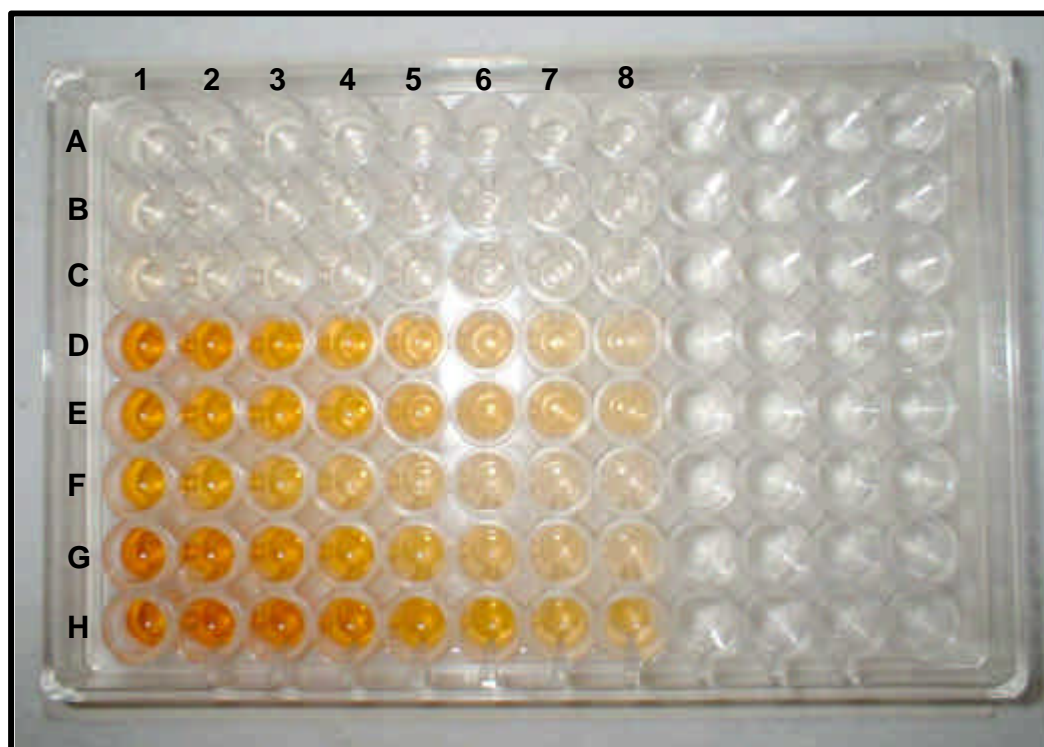


Figura 4: Foto de uma placa de microtitulação após a realização de todos os passos de titulação dos anticorpos anti H_Y pelo ELISA. Legenda: Nas três primeiras linhas (A a C) estão os controles da reação (sem antígeno, sem anticorpo primário e o negativo – soro de rata não submetida à imunização, respectivamente), nas linhas D a H estão os soros testados. A diluição foi realizada serialmente da coluna 1 até a coluna 8.

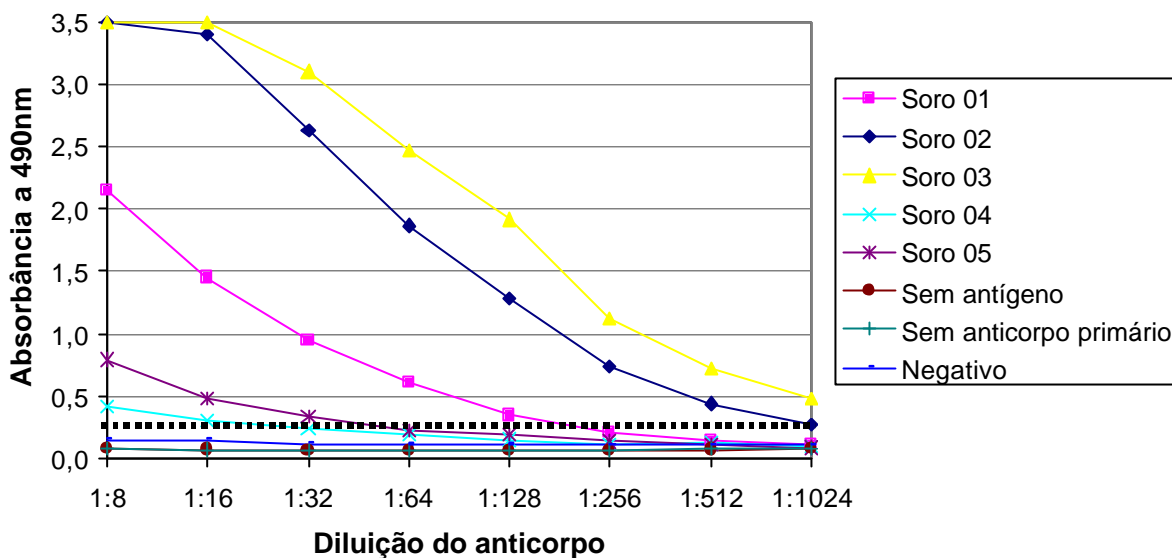


Figura 5: Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 01 a 05, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo.

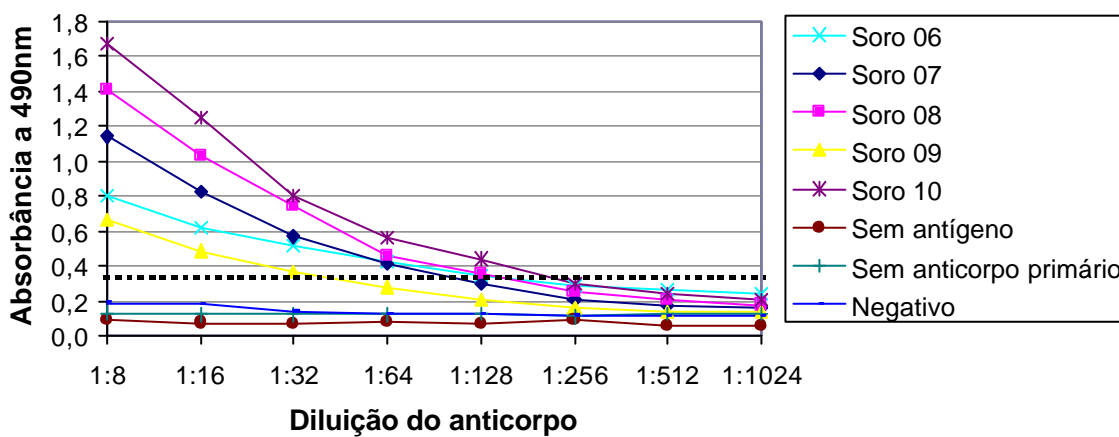


Figura 6: Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 06 a 10, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo.

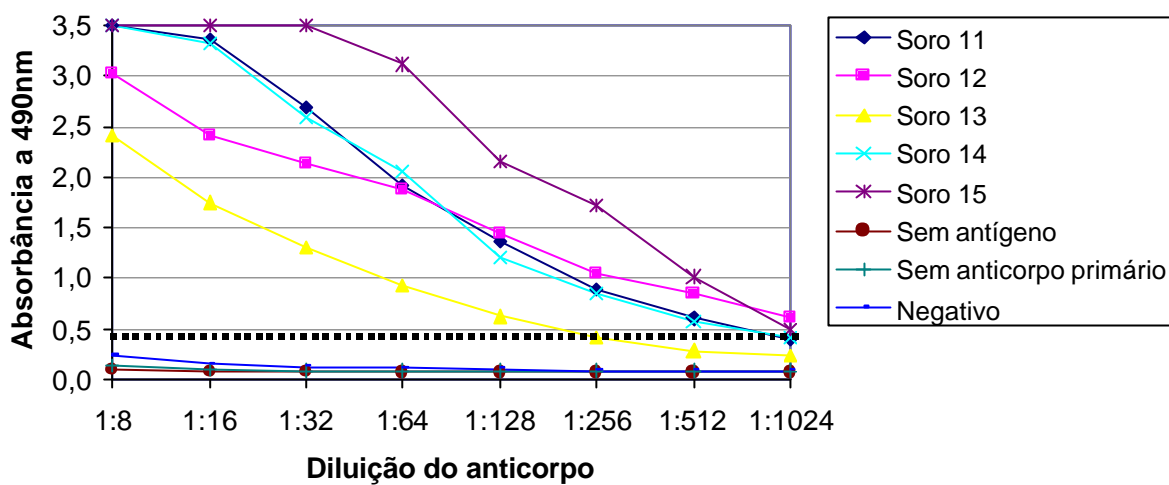


Figura 7. Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 11 a 15, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo.

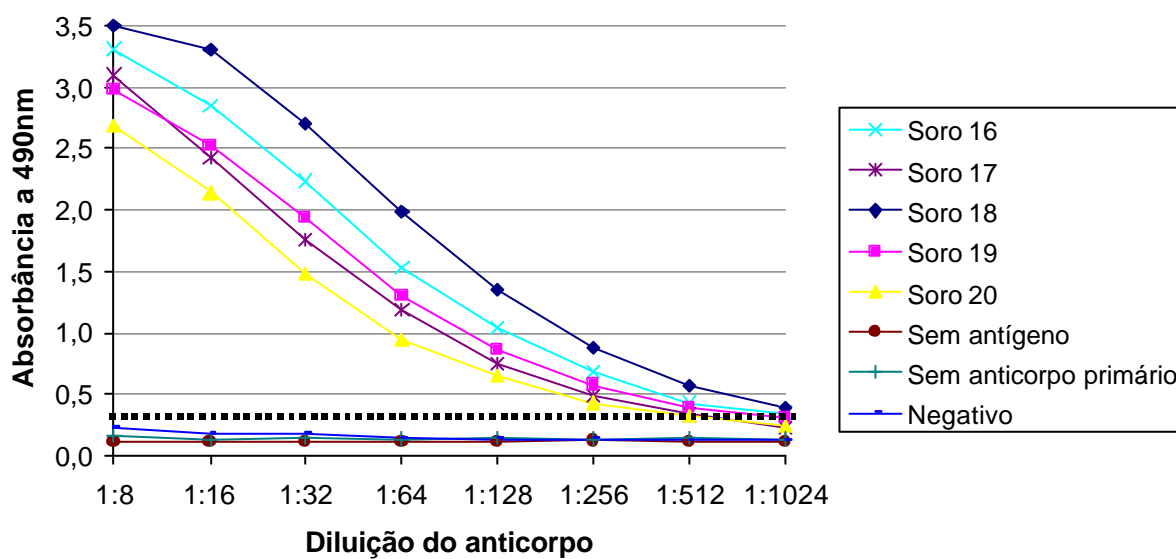


Figura 8. Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 16 a 20, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo.

A atividade de dois soros (02 e 03) foi testada quanto a possível perda da atividade biológica quando submetidos ao seguinte processo: descongelamento (titulação ou utilização em cultivo de embriões), congelamento (retorno à estocagem) e posterior descongelamento (re-titulação ou re-utilização em cultivo de embriões). Como pode ser observado na Figura 9, os títulos dos soros testados mantiveram-se inalterados.

Na curva da atividade biológica, os títulos dos soros 03, 12, 14 e 15, na primeira titulação, ficaram acima da linha de corte (Figura 5 e 7), devido a este fato, foi realizada uma nova titulação com diluições que variaram de 1:16 a 1:2048, verificando-se, desta forma, que os respectivos soros possuíam um título de 1:2048 (Figura 10).

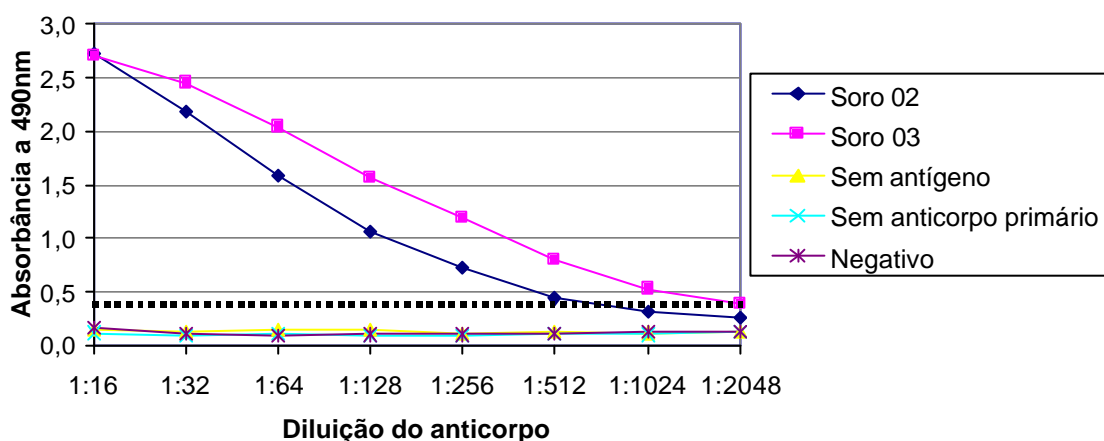


Figura 9. Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 02 a 03, submetidos à descongelamento e congelamento, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo.

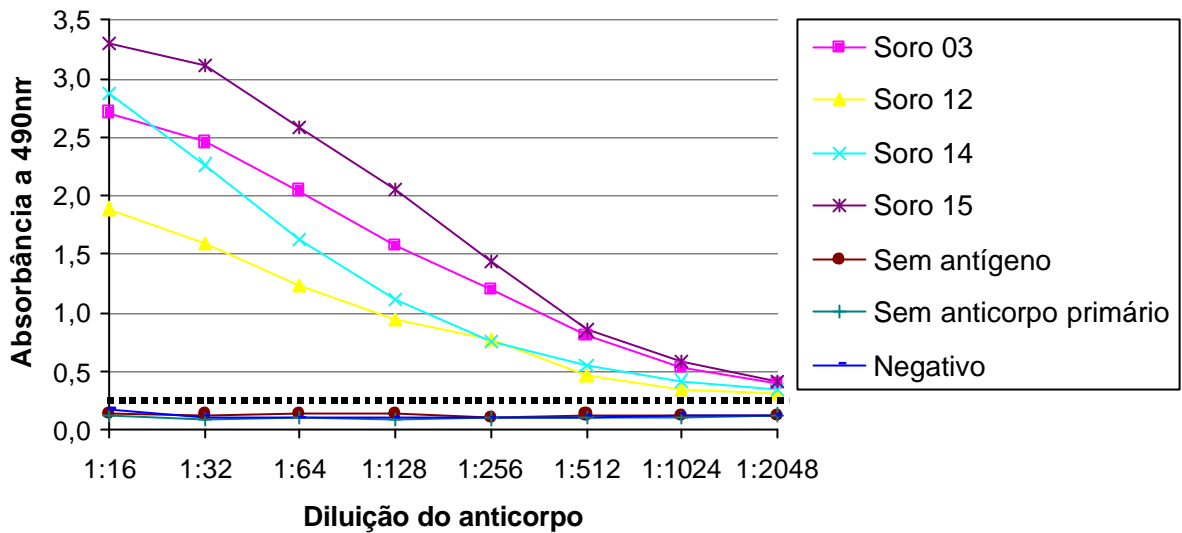


Figura 10. Curva da atividade biológica dos anticorpos dos soros de número 03, 12, 14 e 15, com valores de absorbância em função da diluição do anticorpo. A linha horizontal pontilhada corresponde à leitura de corte.

4.2 – Identificação do sexo por inibição do desenvolvimento embrionário

Depois de 24 horas de cultivo dos embriões produzidos *in vitro* na presença de anticorpos anti H-Y, estes puderam ser separados em dois grupos distintos, de acordo com o desenvolvimento embrionário: 1) embriões que continuaram normalmente seu desenvolvimento durante o cultivo formando a blastocle (Figura 12) e embriões que tiveram seu desenvolvimento interrompido, permanecendo no estágio de mórula (Figura 13). Do total de 134 embriões, 79 (58,96%) ficaram inibidos, ou seja, que permaneceram em estágio de mórula (prováveis machos) e 55 (41,04%) não sofreram inibição (prováveis fêmeas). Na Tabela 3 e na Figura 11 encontra-se, resumidamente, o resultado da produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados na presença de anticorpos anti H-Y.

Tabela 3. Resumo da produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados na presença de anticorpos anti H-Y, com total de mórulas (inibidas por anticorpos anti H-Y), total de blastocistos (não inibidos por anticorpos anti H-Y), a proporção sexual prevista (%) e o com o total de embriões produzidos nas repetições e o desvio padrão.

Repetição	Número de embriões	Mórulas (inibidas pelo H-Y)	Blastocistos (não inibidos pelo H-Y)	Prováveis machos (mórulas) (%)	Prováveis fêmeas (blastocistos) (%)
1	38	24	14	63,16	36,84
2	47	30	17	63,83	36,17
3	49	25	24	51,02	48,98
Total de embriões	134 ($\pm 5,86$)	79 ($\pm 3,21$)	55 ($\pm 5,13$)	58,96 ($\pm 7,21$)	41,04 ($\pm 7,21$)

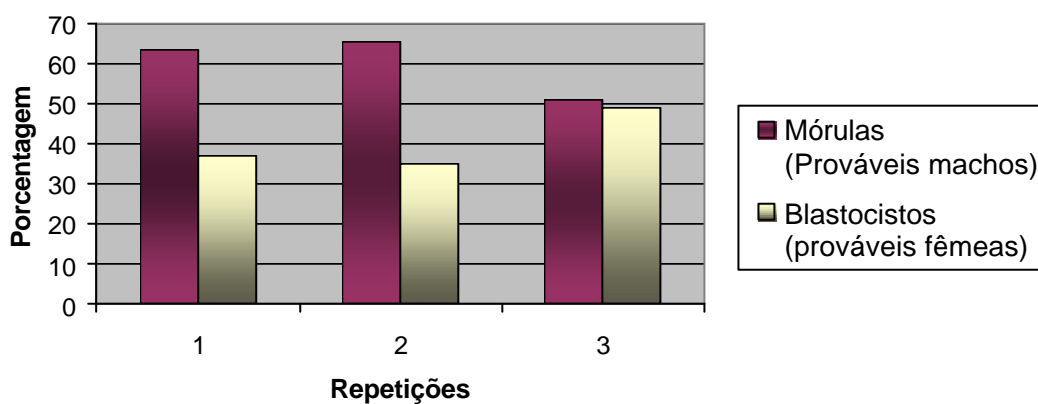


Figura 11. Representação da porcentagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* em três repetições, que ficaram inibidos 24 horas após o cultivo com anticorpos anti H-Y (mórulas) e embriões que continuaram a se desenvolver (blastocistos).



Figura 12. Embriões em estágio de blastocisto e blastocisto inicial, 24 horas após o cultivo com meio contendo anticorpos anti H-Y, que não sofreram inibição do desenvolvimento e classificados como fêmeas.



Figura 13. Embriões em estágio de mórula, após 24 horas de cultivo com meio contendo anticorpos anti H-Y, que sofreram inibição do desenvolvimento e classificados como machos.

4.3 – Verificação do sexo por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Do total de 134 embriões submetidos a sexagem com anticorpos anti H-Y, em 124 (92,5%) foi possível a identificação do sexo utilizando a PCR. No grupo controle, do total de 84 embriões, em 70 (83,3%) foi possível a identificação do sexo. No grupo de embriões sexados com anticorpos anti H-Y, das 78 mórulas (prováveis machos), 49 (62,82%) foram confirmadas como sendo sexo masculino. Dos 46 blastocistos (prováveis fêmeas), 22 (47,83%) foram confirmados como sendo do sexo feminino (Tabela 4). No grupo controle, a proporção sexual foi de 55,57% de embriões do sexo feminino e 44,43% de embriões do sexo masculino. Com análise estatística pelo teste do Qui-quadrado foi possível observar que somente na sexagem de mórulas conseguiu-se obter um desvio da proporção sexual ($P < 0,05$) em relação à proporção sexual do grupo controle.

Os padrões de amplificação do DNA de embriões bovinos produzidos *in vitro* encontram-se na Figura 14. O embrião foi classificado como do sexo masculino quando se observou uma banda de 280pb e outra banda de 210pb na amostra A, relativa ao genoma bovino e ao DNA de machos bovinos, respectivamente, e, na amostra B observou-se uma banda de 250pb relativa a uma sequência repetida em machos. O embrião foi classificado como fêmea, quando se observou uma única banda de 280bp na amostra A. Em todas as repetições, estavam presentes o marcador de peso molecular (“Ladder”), um controle negativo, um controle de macho e um controle de fêmea.

Tabela 4: Resultados obtidos após a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* por inibição do desenvolvimento embrionário, embriões do grupo controle e confirmação dos resultados por PCR.

Estádio (provável sexo)	Número de embriões	Número de embriões (%)	
		Macho	Fêmea
Mórula (macho)	78	49 (62,82%)	29 (37,18%)
Blastocisto (fêmea)	46	46 (52,17%)	22 (47,83%)
Total	124	-	-
Controle	70	32 (44,43%)	38 (55,57%)

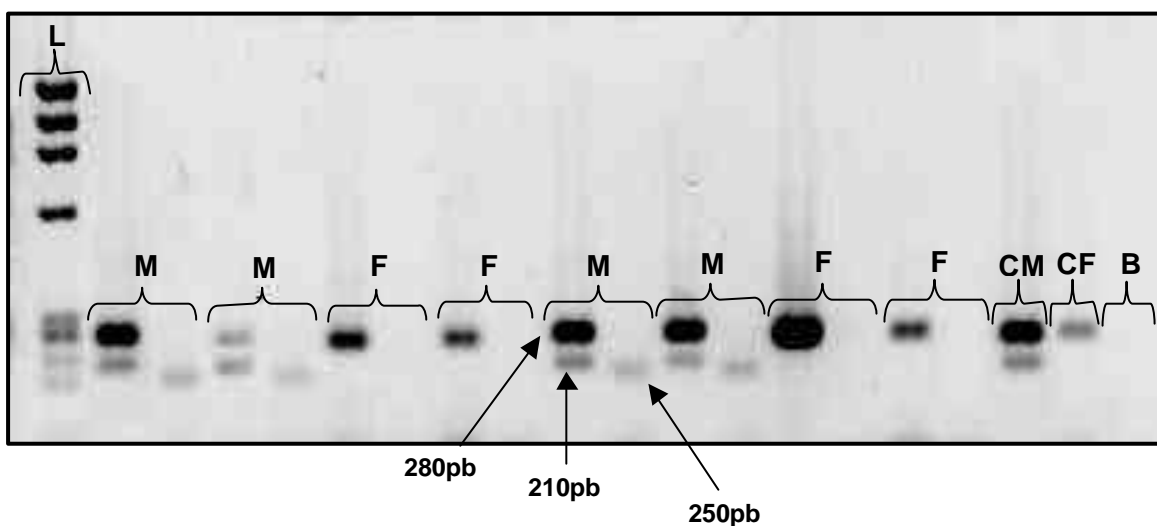


Figura 14: Gel de agarose dos padrões de amplificação por PCR de DNA de embriões bovinos produzidos *in vitro* corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos com 280pb, 210pb e 250pb. Legenda: L ("ladder" – marcador de peso molecular), F (embrião fêmea), M (embrião macho), CM (controle macho), CF (controle fêmea) e B (controle branco).

5. DISCUSSÃO

5.1 – Produção de anticorpos anti H-Y

A metodologia descrita neste trabalho foi baseada no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* com anticorpos anti HY, sendo que os anticorpos foram obtidos imunizando-se ratas isogênicas da linhagem Wistar Furth, com idade variando de 45 a 55 dias.

A opção pela produção de anticorpos anti H-Y utilizando-se linhagem isogênica de ratos e não de camundongos, seguiu os resultados obtidos por SHALEV *et al.* (1978), na qual demonstraram, que títulos de anticorpos anti H-Y com maior atividade biológica foram obtidos quando se utilizou linhagens isogênicas de ratos ao invés de linhagens isogênicas de camundongos, resultados estes confirmados por trabalhos posteriores (BRADLEY & HESLOP, 1985; RAMALHO, 1999). Apesar de utilizarmos uma linhagem de ratos diferente dos trabalhos anteriores, como a linhagem DA (SHALEV *et al.*, 1978), linhagens BN e HS (BRADLEY & HESLOP, 1985), linhagens Wistar e DA (UTSUMI *et al.*, 1991) e linhagem NAR (RAMALHO, 1999), conseguimos a produção de anticorpos de alto título utilizando a linhagem isogênica Wistar Furth.

Com os resultados obtidos neste trabalho, demonstrou-se que ratas da linhagem Wistar Furth são eficientes para a produção de anticorpos anti H-Y quando imunizadas por via parênquima esplênico, e realizado um reforço por via intraperitoneal por volta de 18 dias após a primeira imunização, e a colheita do soro contendo anticorpos anti H-Y efetuando-se dez dias após o último reforço da imunização. Utilizando-se este protocolo conseguimos anticorpos com atividade biológica de até 1:2048, o que ficou acima dos títulos obtidos por RAMALHO (1999) que foi de até 1:1024. Entretanto, este título ficou

muito abaixo dos títulos obtidos por BRADLEY & HESLOP (1985), que conseguiram títulos de 1:4000 empregando-se ratas da linhagem BN e colhendo o soro na primeira e segunda semana após a imunização e títulos de 1:8000 para a linhagem HS quando o soro foi colhido na terceira semana após a imunização.

Vale salientar que BRADLEY & HESLOP (1985) empregaram um tecido diferente para imunização por via parênquima esplênico, que foi a pele de ratos de mesma linhagem, enquanto que utilizamos leucócitos extraídos do baço, devido à facilidade de obtenção e de imunização. Além disso, como demonstrado em trabalhos anteriores, existe uma variação da capacidade de reposta imune de ratos de linhagens isogênicas, mesmo seguindo-se protocolos semelhantes de imunização, comparando-se os resultados obtidos no nosso estudo e aos de RAMALHO (1999). Outro fator importante observado, além da variação entre as linhagens, foi a variação individual da titulação dos anticorpos (Tabelas 1 e 2), mesmo quando as imunizações foram executadas no mesmo dia. Com isso, a opção de utilizarmos esta linhagem foi devido à oportunidade de trabalharmos com ela, já que foram doadas.

Uma outra justificativa para diferenças nos títulos dos anticorpos anti H-Y encontrados neste trabalho (1:2048) e nos trabalhos executados por BRADLEY & HESLOP (1985) que variaram de 1:4000 a 1:8000, poderia ser a confiabilidade do ELISA devido a altos níveis de "background reactivity", em torno de 1:200, quando se utilizam outras fontes de antígeno H-Y que não seja sobrenadante de células Daudi, já que empregamos sobrenadante de células TM-4. Apesar disto, anteriormente, BRUNNER *et al.* (1984b) demonstraram que o sobrenadante de células TM-4 apresentou reação antígeno-anticorpo mais forte quando comparado ao sobrenadante de células Daudi.

5.2 – Identificação do sexo por inibição do desenvolvimento embrionário

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam parcialmente que embriões bovinos em estágio de mórula podem ser separados imunologicamente pela presença ou ausência do antígeno H-Y, na qual embriões puderam ser classificados como machos e

fêmeas, utilizando-se a técnica de inibição do desenvolvimento embrionário (UTSUMI & IRITANI, 1993).

A confirmação dos resultados foi parcial devido ao fato de que estes ficaram abaixo dos resultados publicados por AVERY & SCHIMDT (1989), UTSUMI & IRITANI (1993) e mais recentemente por RAMALHO *et al.* (2000). Nestes trabalhos a acuidade para a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vivo* foi em média de 83% para mórulas (classificados como machos) e 80% para blastocistos (classificados como fêmeas). Utilizando embriões produzidos *in vitro* conseguimos identificar corretamente o sexo de 62,82% das mórulas, enquanto que a identificação dos blastocistos foi somente 47,83%.

Contudo, os resultados que obtivemos para a sexagem de mórulas ficaram dentro da variação obtida por VEERHUIS *et al.* (1994), que sexaram embriões bovinos produzidos *in vivo* com anticorpos anti H-Y monoclonais e obtiveram uma acuidade que variou de 58 a 71%. Os autores justificaram esta variação devido a uma baixa afinidade do antígeno H-Y à superfície celular.

Uma possibilidade de ocorrência de erros na identificação do sexo quando anticorpos anti H-Y são utilizados para inibição do desenvolvimento embrionário, pode ser devido à qualidade morfológica ruim dos embriões, fato confirmado por UTSUMI *et al.* (1993), que impede uma classificação correta dos embriões já que estes necessitam estar exatamente em estágio de mórula para que os anticorpos anti H-Y atuem efetivamente. Os embriões produzidos *in vitro* não apresentam esta qualidade morfológica requerida, ou seja, eles possuem uma qualidade menor do que os embriões produzidos *in vivo*, além disso, apresentam uma menor capacidade de clivar normalmente para o estágio de blastocisto, e um citoplasma mais escuro e uma maior sensibilidade à temperatura (WRIGHT & ELLINGTON, 1995; RIZOS *et al.*, 2001).

Este fato poderia ocasionar uma classificação errônea dos embriões ou impedir uma visualização de estádios iniciais dos blastocistos, ou seja, a visualização do início da formação da blastocele. Este problema, contudo, é difícil de contornar, pois o momento de clivagem dos embriões é uma característica individual, e irão existir embriões em vários

estádios de desenvolvimento o que dificulta uma aplicação mais uniforme desta técnica no mesmo momento e em um mesmo grupo de embriões. Alternativamente, pode-se classificar os embriões segundo a sua qualidade e separá-los em grupos antes da adição do soro contendo anticorpos anti H-Y, como descrito por AVERY & SCHMIDT (1989). Os autores classificaram os embriões bovinos em quatro classes (excelentes, bons, satisfatórios e ruins), o que requer um pouco mais de tempo e uma maior manipulação dos embriões, e poderia ocasionar danos aos mesmos, além de não ser muito prático para a uma rotina de sexagem de embriões. Além disso, os embriões produzidos *in vitro* apresentam alterações significativas na sua ultra-estrutura e organelas celulares quando comparados com embriões produzidos *in vivo* conforme descrito nos trabalhos de CROSIER *et al.* (2000) e PIVKO *et al.* (2003), que indicaram alterações celulares como aparência mais escura e menor número de organelas e um maior número de estruturas semelhantes a lisossomos no citoplasma. Com isso, possivelmente, a ligação dos anticorpos anti H-Y poderia ocorrer de uma forma diferente ou não estar se ligando corretamente ao antígeno H-Y presente na membrana dos embriões produzidos *in vitro*, já que em pesquisas anteriores somente embriões produzidos *in vivo* foram utilizados para a sexagem pela técnica de inibição do desenvolvimento embrionário.

VEERHUIS *et al.* (1994), sugeriram que os anticorpos anti H-Y poderiam combinar-se de forma inespecífica às células fêmeas, além de possuir uma baixa afinidade com o antígeno H-Y que está associado à superfície celular, o que poderia ocasionar erros durante a inibição do desenvolvimento dos embriões. Os autores constataram que os anticorpos anti H-Y possuíam afinidade com sobrenadante de células TM-4 e de células Daudi, o que era esperado, pois são provenientes de células masculinas e, portanto, fontes de antígeno H-Y. Porém possuíam também afinidade ao sobrenadante de células femininas, a GM3399A (linfócitos de mulheres) e CRL6331 (ovário de camundongo), o que não poderia ocorrer, já que estes não contêm antígeno H-Y.

Um fato importante a ser considerado é a morte ou parada do desenvolvimento do embrião em estágio de mórula, o que incorreria numa falsa predição de que este estaria inibido pelos anticorpos anti H-Y.

Comparando-se a técnica de inibição do desenvolvimento embrionário por anticorpos anti H-Y com o método de biologia molecular (PCR), este último possui uma característica importante que é a acuidade na sexagem que pode chegar a 99% (BREDBACKA *et al.*, 1995). Contudo por tratar-se de uma técnica invasiva, ocorre o rompimento da zona pelúcida para a retirada de uma amostra do DNA contida em um blastômero, o que impede a comercialização internacional dos embriões devido a precauções sanitárias (HOSSEPIAN DE LIMA *et al.*, 1993; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2000).

A acuidade das técnicas não invasivas (imunológicas), ou seja, a citotoxicidade, imunofluorescência indireta e a inibição do desenvolvimento embrionário são semelhantes, e os resultados variam de 82 a 90% (WHITE *et al.*, 1982; HOSSEPIAN DE LIMA *et al.* 1993; MOREIRA-FILHO *et al.*, 2000). Porém a citotoxicidade elimina os embriões do sexo masculino e a imunofluorescência indireta requer equipamentos de alto custo e técnicos treinados. Já a inibição do desenvolvimento embrionário não necessita de equipamentos e pessoal treinado para a execução, e, além disso, tanto embriões do sexo masculino como do sexo feminino podem ser aproveitados.

Apesar dos resultados obtidos no nosso estudo estarem diferentes do esperado, estes sugerem que é possível a sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* com anticorpos anti H-Y, desde que estes possuam um alto título e que seja utilizado embriões com boa qualidade morfológica, porém não impede que possam ocorrer erros na identificação do sexo, devido a uma qualidade peculiar dos embriões de FIV, na qual possuem uma qualidade morfológica inferior e alterações celulares quando comparados com embriões produzidos *in vivo*.

Mais pesquisas são necessárias para determinar as diferenças entre embriões produzidos *in vivo* daqueles produzidos *in vitro* utilizando anticorpos anti H-Y. Além disso, determinar a possível influência de componentes do meio de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões quando anticorpos anti H-Y são utilizados para a seleção do sexo por inibição do desenvolvimento embrionário.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e análise estatística pode-se concluir que:

- A linhagem Wistar Furth foi eficiente quanto à produção de anticorpos anti H-Y de alto título quando submetidas à primeira imunização com idade entre 45 e 55 dias, obtendo-se um título de até 1:2048, sendo que a atividade dos soros diferiram entre as famílias de ratos desta linhagem.
- Não ocorreu perda da atividade biológica dos anticorpos, enquanto estocados a uma temperatura de 80°C negativos até 102 dias de estocagem.
- A sexagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* por inibição do desenvolvimento embrionário na presença de anticorpos anti H-Y foi eficiente somente nos embriões em estágio de mórula (inibidos pelos anticorpos), o que não ocorreu com os blastocistos (não inibidos pelos anticorpos).
- A acuidade na sexagem foi menor do que a descrita na literatura para embriões produzidos *in vivo*, o que pode ser devido à qualidade morfológica inferior, peculiar dos embriões produzidos *in vitro*, e/ou devido aos componentes do meio de cultivo que podem alterar ligações dos anticorpos anti H-Y com receptores presentes na membrana celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

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

ARNHOLD, I. J.; MENDONÇA, B. B.; BISI, H.; RUSSO, F. O.; NICOLAU, W.; BLOISE, W.; MOREIRA-FILHO, C. A. Normal expression of the serologically defined H-Y antigen in Leydig cell hypoplasia. **J. Urol.**, Baltimore, v.140, p.2-4, 1988.

AVERY, B.; SCHMIDT, M. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. **Acta Vet. Scand.**, Copenhagen, v. 30, n. 2, p. 155-164, 1989.

BONDIOLI, K. R.; ELLIS, S. B.; PRYOR, J. H.; WILLIAMS, M. W.; HARPOLD, M. M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, p. 95-104, 1989.

BRADLEY, M. P.; HESLOP, B. F. Elicitation of a rapid and transient antibody response to H-Y antigen by intrasplenic immunization. **Transplantation**, Hagerstown v. 39, n. 6, p. 634-638, 1985

* Referências bibliográficas formatadas segundo a ABNT-NBR 6023 de agosto de 2002 / A consulta do local de publicação dos periódicos foi realizada pelo "site" do Instituto de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT) e pelo "site" da PUBMED.

BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Sex-related cleavage rate difference in bovine embryos produced *in vitro* is controlled by glucose. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 1, p. 191, 1996.

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

BRUNNER, M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; WACHTEL, G.; WACHTEL, S. S. On the secretion of the H-Y antigen. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 615-619, 1984

BRUNNER, M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; WACHTEL, G.; WACHTEL, S. S. H-Y typing in the ELISA. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 203-209, 1984.

CULLEN, S. E.; BERNOCO, D.; CARBONARA, A.; JACOTI-GILLAERMO, D. H.; TRINCHIERI, G.; CEPPELINI, R. Fate of HL-A antigens and antibodies at the lymphocyte surface. **Transplant. Proc.**, Orlando, v. 5, n. 4, p. 1835-1847, 1973.

COTINOT, C.; KIRSZEMBAUM, M.; LEONARD, M.; GIANQUINTO, L.; VAIMAN, M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential using in embryo sexing. **Genomics**, Orlando, -653, 1991.

CROSIER A. E.; FARIN P. W.; DYKSTRA M. J.; ALEXANDER J. E.; FARIN C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 62, n.5, p.1459-65, 2000.

EICHWALD, R. G.; SILMSER, C. R. Untitled. **Transplant. Bull.**, Salt Lake City, v. 2, p. 148, 1955.

ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. (1986): Nucleic acid probes for prenatal sexing. International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) World Intellectual Property Organization. Publication No. WO 86/07095.

ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M (1988): Nucleic acid probes for prenatal sexing. U.S. Patent No. 4,769,319.

ELLIS, S. B.; BONDIOLI, K. R.; WILLIAMS, M. E.; PRYOR, J. H.; HARPOLD, M. M. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, Stoneham, 42, 1988.

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L.; VANDER ZWAAG, D. F.; FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, Stoneham, 59, n. 1, p. 125-138, 2003.

GARCIA, J.M. **Sexagem de embriões murinos e suínos através da análise cromossômica**. Botucatu: UNESP, 1993. 172p. Tese (Doutorado em genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

GARCIA, J. M.; SENEDA, M. M.; VERONA C. E. S. Inibição parcial do desenvolvimento de embriões murinos, pelo anticorpo anti H-Y. VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 14 a 16 de agosto de 1992 Jaboticabal, SP, Brasil. **Anais...** Jaboticabal, SP, Brasil.

GOODFELLOW, P. N.; CRAIG, I. W.; SMITH, J. C. Mammalian Y chromosome: molecular search for the sex determining factor. **Development**, Cambridge, v.101, p.203, 1987. (Supplementum).

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**, Stoneham, v. 55, n, 5 p. 1117-1126, 2001.

HANDYSIDE, A. H.; PENKETH, R. J. A.; WINSTON, R. M. L.; PATTINSON, J. K.; DELHANTY, J. D.; TUDDENHAM, E. G. D. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, London, v.1, n. 8634, p.347-349, 1989.

HERR, C. M.; HOLT, N. A.; MATTHAEI, K. I.; REED, K. C. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome - detection assay. **Theriogenology**, Stoneham, v.33, n.1, p.247, 1990a.

HERR, C. M.; MATTHAEI, K. I.; PETRZAK, U.; REED, K. C. A rapid Y-chromosome - detecting ovine embryo sexing assay. **Theriogenology**, Stoneham, v.33, n.1, p.245, 1990b.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; DE BEM, A. R.; JORGE, W.; MOREIRA-FILHO, C. A. Effect of cell cycle synchronization on the accuracy of murine and bovine embryo sex determination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p.521-534, 1994.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; DE BEM, A. R.; JORGE, W. Sex determination of murine and bovine embryos using citotoxicity and immunofluorescence assays. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p.1343-1352, 1993.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; RAMALHO, M. D. T.; RODRIGUES, L. H.; MALHEIROS, E. B.; MOREIRA-FILHO, C. A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

JOST, A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. **Philos. Transf. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, London, v. 259, n. 828, p.119-130, 1970.

KIRSZENBAUM, M.; COTINOT, C.; LEONARD, M.; VAIMAN, M.; FELLOUS, M. Diagnosis of the sex of bovine embryos using molecular biology. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, Suppl. 1, p. 125s-132s, 1990

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.**, New York, v. 20, n. 3, p.525-534, 1985.

MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. D. T.; KIRNZENBAUM, M.; COTINOT, C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 483, 2000.

MURAMATSU, K.; KUROKAWA Y.; IHARA K.; SAKAMOTO S.; YOU-XIN S.; KAWAI, S. Behavior of male-specific minor histocompatibility antigen in skin and limb transplantation. **J. Surg. Res.**, New York, v. 115, n. 1, p. 106-112, 2003.

NICHOLAS, F. W.; SMITT, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Anim. Prod.**, Bletchley, v.36, p.341-353, 1983.

OGOUE, T.; OKADA, T. S.; TAKEICHI, M. Cleavage-stage mouse embryos share a common cell-adhesion system with teratocarcinoma cells. **Dev. Biol.**, San Diego, v.92, p. 521-528, 1982.

OHNO, S.; NAGAI, Y.; CICCARESE, S.; SMITH, R. *In vitro* studies of gonadal organogenesis in the presence and absence of H-Y antigen. **In vitro**, Rockville.15, p.11-18, 1978.

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**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2001.

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

PIVKO, J.; LANDA, V.; KUBOVICOVA, E.; SUPOVA, A.; GRAFENAU, P.; MAKAREVIC, A.; RIHA, L.; ZIBRIN, M. Comparative morphometry of precompacted bovine embryos produced in vivo or invitro after parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection(ICSI): ultrastructural analysis. **Zygote**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 207-217, 2003.

RAMALHO, M.D.T. **Estudo da inibição do desenvolvimento de embriões murinos por anticorpos anti H-Y**. Jaboticabal: UNESP/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1999. 86p. Dissertação (Mestrado).

RAMALHO, M.D.T.; ALVES, B. C. A.; MOREIRA-FILHO, C. A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Sexing of murine and bovine embryos by development arrest induced by high titer H-Y antisera. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 484, 2000.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, n. 1, p. 1-16, 2001.

SCHWERIN, M.; BLOTTNER, S.; THOMSEN, P. D.; ROSCHLAU, D.; BROCKMANN, G. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.30, n. 1, p.39-43, 1991.

SEIDEL Jr., G. E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology, and biology. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 79, n. 3-4, p. 145-156, 2003.

SHALEV, A; BERCI, I.; HAMERTON, J. L. The H-Y antigen production of antibodies, detection and cross-reaction between mouse, rat and human. **Cytogenet. Cell. Genet.**, Basel, v. 22, p. 672-675, 1978.

SHELTON, J. A.; GOLDBERG, E. H. Male restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. **Transplantation**, Baltimore, v.37, n.1, p.7-8, 1984.

SIMPSON, E.; SCOTT, D.; CHANDLER, P. The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 15, p. 39-61, 1997.

SIMPSON, E. The case of the midwife scientist. **Int. J. Dev. Biol.**, Vizcaya, v. 45, n. 3, p. 513-518, 2001.

SMITH, C. Applications of embryo transfer in animal breeding. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, n. 1, p. 203-212, 1988.

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

UTSUMI, K.; IRITANI, A. Characteristics of an anti-testis antibody effective in sexing rat embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 26, n. 1, p. 206, 1986.

UTSUMI, K.; SATOH, E.; IRITANI, A. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. **J. Exp. Zool**, New York, v. 260, p. 99-105, 1991.

UTSUMI, K.; HAYASHI, M.; TAKAKURA, R.; UTAKA, K.; IRRITAN, A. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and developmental confirmation in cattle embryos. **Mol. Reprod. Develop.**, New York, v. 34, p. 25-32, 1993.

UTSUMI, K.; IRITANI, A. Embryo sexing by male specific antibody and by PCR using male specific (SRY) primer. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v. 36, p. 238-241, 1993.

VAN VLECK, L. D.; JOHN POLLAK, E.; BRANDFORD OLTENACU, E. A. **Genetics for the animal science**, Stoneham: W.H. Freeman, cap.13, p. 287-313, 1987.

VEERHUIS R; HENDRIKSEN P. J.; HENGST A.M.; KRUIJT L.; TIEMAN M.; BOOMAN P. The production of anti-H-Y monoclonal antibodies: their potential use in a sex test for bovine embryos. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 42, n. 3-4, p. 317-30, 1994.

WACHTEL, S. S. **H-Y antigen and biology of sex determination**. Stoneham: Grune and Stratton, 302p., 1983.

WACHTEL, S. S.; NAKAMURA, D.; WACHTEL, G.; FELTON, W.; KENT, M.; BOYSE, E. A. Sex selection with monoclonal H-Y antibody. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.50, n.2, p.355-360, 1988.

WARREN, E. H.; GAVIN, M. A.; SIMPSON, E.; CHANDLER, P.; PAGE, D.C.; DISTECHE, C., STANKEY, K. A.; GREENBERG, P. D.; RIDDELL, S.R. The Human UTY Gene Encodes a Novel HLA-B8-Restricted H-Y Antigen. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, n. 5, p. 2087-2814, 2000.

WHITE, K. L.; ANDERSON, G. B.; BERGER, T. J.; BONDURANT, R. H. Identification of male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryo. **Gamete Res.**, New York, v.17, p.107-103, 1987b.

WHITE, K. L.; LINDNER, G. M.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. **Theriogenology**, Stoneham, v. 18, n. 6, p. 655-662, 1982.

WHITE, K. L.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 37, n. 4, p. 867-873, 1987a.

WHITE, K. L.; ANDERSON, G. B.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R.H. Detection of Histocompatibility - Y antigen of sex of preimplantation ovine embryos. **J. Reprod. Immunol.**, New York, v.10, n. 1, p. 27-32, 1987c.

WHITE, K. L.; BRADBURY, M. W.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Immunofluorescent detection of male-specific factor on preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p. 275, 1984.

WHITE, K. L.; LINDNER, G. M.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.19, n.5, p.701-705, 1983.

WOLF, U. The serologically detected H-Y antigen revisited. **Cytogenet Cell Genet**, Basel, v. 80, n. 1-4, p. 232-235, 1998.

WOOD, T. C.; WHITE, K. L.; GARZA Jr., F.; THOMPSON Jr., D. L.; WIEMER, K. E. Detection of H-Y antigen on equine blastocysts. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, n. 1, p. 331, 1988.

WRIGHT, R. W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between *in vivo*- and *in vitro*-production preimplantation embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, n. 8, p. 1167-1189, 1995.

YOUNGS, C. R.; HUMES, P. E.; GODKE, R. A. Genetic aspects of embryo transfer and embryo micromanipulation. In: WORLD CONGRESS ON GENETIC APPLICATION TO LIVESTOCK PRODUCTION, 3rd, 1986. **Proceedings...** p. XIII:115.

8. APÊNDICES

1. Preparação das soluções para ELISA

1.1 – Tampão citrato pH 4,5

Solução A:

Na₂HPO₄ _____ 0,595g

Água bidestilada qsp _____ 50mL

Solução B:

Ácido Cítrico (C₆H₈O₇) _____ 0,350g

Água bidestilada qsp _____ 50mL

Misturar as duas até obter o pH de 4,5. Sugestão: misturar 16 mL de solução A e 34mL de solução B. Ajustar pH com solução A (básica) ou solução B (ácida)

1.2 – Ácido Sulfúrico 4N

Ácido Sulfúrico _____ 5,55mL

Água bidestilada _____ 50mL

1.3 – PBS-BSA

1.3.1 - PBS-BSA a 0,05%

BSA _____ 0,07g

PBS _____ 140mL

1.3.2 – PBS-BSA a 1%

BSA _____ 0,17g

PBS _____ 17mL

1.3.3 - PBS-BSA a 3%

BSA _____ 0,45g

PBS _____ 15mL

1.4 – Anticorpo secundário

2,33µL em 7mL de PBS-BSA a 1%

1.5 – Substrato da reação

0,007g de ortofenildiamina (OPD) + 7 μ L de peróxido de hidrogênio a 30% em 7mL de tampão citrato pH 4,5.

1.6 - Interrupção da reação

7mL de Ácido Sulfúrico 4N

OBS: a quantidade das substâncias descritas nos itens 1.3 a 1.5 é suficiente para uma placa, onde a titulação será da coluna 1 até a coluna 8, com diluição feita nas linhas da placa utilizando-se três controles (linhas A, B e C) e cinco amostras a serem testadas (linhas D, E, F, G e H)

3. Meios utilizados na produção *in vitro* de embriões

3.1 –Meio de lavagem de oócitos (TCM 199 Hepes)

Solução Mãe TCM 199 Hepes

Água Milli-Q _____	10mL
TCM 199 _____	0,095g
Bicarbonato _____	5mM
Hepes Sódico _____	10mM
Hepes Ácido _____	10mM

Meio de Lavagem (para 10mL)

Solução Mãe TCM 199 Hepes _____	9mL
SFB _____	1mL
Piruvato _____	20 μ L (100mM)
Antibiótico (Amicacina) _____	50 μ L (16,67 μ g/ μ l)

3.2 – Meio de maturação de oócitos (para 10mL)

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato

Água Milli-Q _____	10mL
TCM 199 _____	0,095g
Bicarbonato _____	26mM

Meio de maturação para uso (para 10mL)

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	___	9mL
SFB	_____	1mL
Piruvato	_____	20µl
Antibiótico	_____	50µl
FSH	_____	10µl
hCG	_____	100µl

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e acrescentar o estradiol.

Estradiol	_____	10µl
-----------	-------	------

3.3 - Meio FIV-Gotas (quantidade para 2 touros)

TL-Stock	_____	3,6mL
Antibiótico	_____	20µl
Piruvato	_____	8µl
PHE	_____	160µl
Heparina	_____	40µl
BSA (6mg/mL)	_____	0,024g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e deixar na estufa úmida de CO₂ com a tampa do frasco frouxa, para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

3.4 – Meio SOF

SOF estoque (para 10mL)

Água Milli-Q	_____	7,8mL
Estoque A	_____	1mL
Estoque B	_____	1mL
Estoque D	_____	100µl
L-Glutamina	_____	10µl
MEM Essenciais (50X)	_____	100µl

MEM Não-Essenciais (100X)	_____	100µl
Antibiótico	_____	50µl
Myo-Inositol	_____	2,8mM
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ -2H ₂ O	_____	340µM

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

Meio SOF final

SOF estoque	_____	1 mL
Piruvato	_____	2µl
BSA (6mg/mL)	_____	0,006g

Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22µm e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

4. Preparação das soluções para sexagem de embriões por PCR

4.1 – Proteinase K - 1µg/mL

Proteinase K	_____	0,0002g
Tampão 10X PCR	_____	120µL
Água do Milli-Q	_____	80µL

Aliquotar 6µL e congelar

4.2 – TBE 10X

TRIS – colocar no agitador	_____	108g
EDTA sólido	_____	8,3g
Ácido bórico	_____	55g

Quando dissolver tudo, completar o volume com água Milli-Q para 1000mL

4.2 – TBE 1X (solução de uso)

TBE 10X	_____	100mL
Água do Milli-Q qsp	_____	1000mL

4.3 – Azul de bromofenol (6X) – 1 mL

Azul de bromofenol	_____	0,025g
--------------------	-------	--------

Sacarose _____ 4g
Água do Milli-Q autoclavada _____ 10mL

O azul de bromofenol é misturado com o produto de amplificação imediatamente antes de aplicar a amostra no gel, na proporção aproximada de 10 μ L a amostra para 1 μ L a 2 μ L do azul de bromofenol

4.4 – Brometo de etídio a 10mg/mL – 40mL de solução

Brometo de etídio _____ 0,4g
Água _____ 30mL

Colocar no agitador magnético por 2h30min. Completar o volume para 40mL com água. Esta solução é utilizada para corar o gel de agarose após a eletroforese da amostra. Usar 6 μ L de brometo de etídio para cada 100mL de água do Milli-Q ou adicionar diretamente na preparação do gel na mesma proporção anterior.