

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E A PROPORÇÃO**  
**DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***  
**EM PROGRAMA DE SEXAGEM COMERCIAL**

**Rodrigo Vitorio Alonso**

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E A PROPORÇÃO**  
**DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***  
**EM PROGRAMA DE SEXAGEM COMERCIAL**

**Rodrigo Vitorio Alonso**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Venturoli Perri**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP  
2008

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A454f Alonso, Rodrigo Vitorio  
Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro em programa de sexagem comercial / Rodrigo Vitorio Alonso. - Araçatuba : [s.n.], 2008  
57 f. : il. ; tab.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2008  
Orientador: Profa. Silvia Helena Venturoli Perri

1. Micro-manipulação embrionária 2. Fertilização in vitro  
3. Sexagem 4. Embrião 5. Bos taurus 6. DNA

CDD 636.0896

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Rodrigo Vitorio Alonso** - nascido em Ribeirão Preto - SP, dia 06 de março de 1981. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em 2003. Foi representante discente titular no Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal em 2001, bolsista de iniciação científica da FAPESP em 2001, orientado pelo Prof. Dr. Wilson Machado de Souza, e em 2002 e 2003 orientado pelo Prof. Dr. José Fernando Garcia. Possui 5 trabalhos apresentados em congresso na área de reprodução animal. Foi finalista do III Prêmio Santander de Empreendedorismo na área de biotecnologia, em 2007. Atualmente, é sócio-proprietário da Deoxi Biotecnologia Ltda, administrador científico da Transfix - Transplante de Embriões Ltda e coordenador de projeto de inovação tecnológica em pequenas empresas (PIPE-FAPESP). Membro da Diretoria da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE – 2008 e 2009). Possui experiência na área de biologia molecular aplicada na reprodução animal com ênfase em produção de embriões *in vitro*, micro-manipulação embrionária e diagnóstico genético pré-implantacional.

## EPÍGRAFE

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; mas os insensatos desprezam o conhecimento e a instrução.”  
Provérbios 1:7

“...adquire pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento.”  
Provérbios 4:7

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sua infinita graça e constante livramento;

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu tivesse acesso ao mais alto nível de educação e pelo constante incentivo;

A Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pela presente orientação e prontidão em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Adj. José Fernando Garcia, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba, pela orientação durante a graduação, quando começamos a trabalhar com sexagem de embriões; pelos vários momentos de conversa e reflexão; pelos conselhos e incentivos profissionais e pessoais; pela confiança depositada e demonstrada em todo tempo.

A toda equipe da Transfix – Transplante de embriões Ltda, especialmente ao médico veterinário José Abdo de Andrade Hellú, pela parceria e realização da parte de campo deste trabalho e a Altair Martins do Carmo, pelo auxílio na preparação do material e realização dos trabalhos laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA) por me receberem e suportarem meus papéis esparramados por todos os cantos.

A Profa Dra Gisele Zocal Mingoti, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP – Araçatuba pela amizade e pelo constante incentivo.

A Dra. Yeda Fumie Watanabe, Diretora da Vitrogen Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução S/C Ltda, pela colaboração e apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, Diretor da Tec Gene Tecnologia e Genética Animal, pela colaboração.

Ao Dr. Walt Yamazaki, diretor da Bioembryo Fertilização *in vitro* pela colaboração.

A Fert Vitro, em nome do Prof. Halim Atique Netto.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Cenargen, em nome de Dr. Rodolfo Rumpf e Regivaldo Vieira de Souza, pelo fornecimento do sistema de reagentes para a sexagem de embriões.

A todos os criadores que colaboraram neste trabalho, pela confiança depositada.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do curso de Medicina Veterinária, em nome de todos os professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a transmissão e consolidação dos diferentes níveis de conhecimentos fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
REFERÊNCIAS.....	21
2. CAPÍTULO 2 - FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E A PROPORÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> EM PROGRAMA DE SEXAGEM COMERCIAL.....	30
2.1 Resumo.....	31
2.2 Abstract.....	32
2.3 Introdução.....	33
2.4 Material e Métodos.....	36
2.5 Resultados.....	43
2.6 Discussão.....	46
2.7 Agradecimentos.....	49
2.8 Referências.....	50
2.9 Tabelas.....	56
2.10 Figuras.....	59
3. IMPLICAÇÕES.....	59

## **FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E A PROPORÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM PROGRAMA DE SEXAGEM COMERCIAL**

### **RESUMO**

O crescente avanço da produção *in vitro* de embriões bovinos intensificou a utilização de outras biotecnologias da reprodução tais como a micro-manipulação embrionária e o diagnóstico genético pré-implantacional, sendo a identificação do sexo embrionário utilizada na rotina comercial de laboratórios de produção *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as interações de diferentes fatores sobre a taxa de mortalidade embrionária e a proporção do sexo de embriões bovinos submetidos ao processo de sexagem. Foi realizado levantamento no banco de dados da Transfix – Transplante de Embriões Ltda, Patrocínio Paulista / Brasil, referente a 4.650 embriões produzidos *in vitro* e sexados entre 2005 e 2007. Os embriões foram submetidos à micro-manipulação pela técnica de micro-aspiração, e as biópsias à reação em cadeia pela polimerase (PCR). Somente as fêmeas foram transferidas para receptoras previamente sincronizadas. O diagnóstico de gestação e a determinação do sexo fetal foram realizados por ultra-sonografia. As variáveis foram classificadas de acordo com o sexo dos embriões (macho, fêmea e indeterminado), cinco laboratórios (A, B, C, D e E), seis raças bovinas (Nelore, Brahman, Girolando, Simental, Holandês e Jersey), estágio embrionário (MO, BI, BL, BX e BE), qualidade embrionária (1, 2 e 3) e qualidade da biópsia (“dentro do padrão” e “fora do padrão”). As análises estatísticas foram realizadas pelos testes  $\chi^2$  de associação,  $\chi^2$  de aderência para proporção 1:1 e pela análise de regressão logística com o método de Hosmer-Lameshow utilizando o procedimento logístico (PROC LOGISTIC) programa computacional SAS. A PCR apresentou eficiência de 93,3%, acurácia de 93,2% e taxa de machos e fêmeas de 52,9% e 47,1%,

respectivamente. A taxa de mortalidade dos embriões submetidos à biópsia foi de 10,3% e a taxa de gestação foi de 31,7%. Os embriões classificados como “indeterminados” apresentaram maior taxa de mortalidade do que os embriões machos e fêmeas, sendo que entre esses últimos, não houve diferença estatística. A taxa de mortalidade embrionária foi significativamente influenciada pelos laboratórios de produção *in vitro*. Nos embriões de qualidade 2 e 3 a chance de ocorrer morte embrionária após a realização da biópsia foi 3,19 e 11,37 vezes maior, respectivamente, do que nos embriões de qualidade 1. Nos embriões cuja biópsia foi classificada como “fora de padrão”, a chance de ocorrer mortalidade embrionária foi 3,6 vezes maior do que na biópsia “dentro do padrão”. A taxa de mortalidade não foi influenciada pelo estágio do embrião no momento da biópsia ( $P>0,05$ ). Apesar da proporção do sexo ter apresentado desvio significativo a favor dos machos, não foram observadas diferenças entre laboratórios ( $P>0,05$ ) e raças ( $P>0,05$ ) na taxa do sexo de embriões bovinos PIV. Em conclusão, a sexagem de embriões bovinos PIV pode ser utilizada em larga escala, salientando-se que a viabilidade dos embriões submetidos à biópsia foi influenciada pela qualidade do embrião e pelo padrão da biópsia e que não houve influência dos laboratórios e das raças bovinas sobre a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Sexagem embrionária, Micro-manipulação; Fertilização *in vitro*, Embrião, Bovino, DNA.

## **FACTORS AFFECTING THE VIABILITY AND SEX RATIO OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS UNDER COMMERCIAL SEXING PROGRAM**

### **SUMMARY**

Crescent progress of *in vitro* bovine embryo production has improved the use of other reproductive biotechnologies, as embryo micromanipulation and preimplantation genetic diagnosis, being embryo sexing used in commercial routine of *in vitro* embryo production laboratories. The present study aimed to evaluate the interactions among different factors on the mortality rate and sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. A survey was performed in the Transfix – Transplante de Embriões Ltda, Patrocínio Paulista / Brazil data base, referring to 4.650 *in vitro* produced bovine embryos sexed during years 2005/2007. Embryos were submitted to the biopsy by the microaspiration technique, and biopsies to the polymerase chain reaction (PCR). Only female embryos were transferred to synchronized recipients. Pregnancy diagnosis and fetal sex determination were carried out by ultrasound. The variables were classified according embryo sex (male, female and indeterminate), five laboratories (A, B, C, D and E), six bovine breeds (Nellore, Brahman, Girolando, Simmental, Holstein and Jersey), embryo stage (MO, EB, BL, XB and HB), embryo quality (1, 2, and 3) and biopsy quality (“standard” and “non standard”). The statistical analysis was carried out by association  $\chi^2$  test,  $\chi^2$  for 1:1 ratio and logistic regression analysis with Hosmer-Lameshow method using logistic procedure (PROC LOGISTIC) of SAS package. The PCR showed 93.3% efficiency, 93.2% accuracy and male and female ratio of 52.9% and 47.1%, respectively. Mortality rate of biopsied embryos was 10.3% and pregnancy rate was 31.7%. Although no significant differences were observed between male and female ratio, indeterminate embryos possess greater possibility to die after micromanipulation. For quality 2 and 3 embryo mortality rate after

biopsy was 3.19 and 11.37 fold higher, respectively, than for quality 1 embryo. For those whose biopsy was classified “non standard” embryonic mortality rate was 3.6 fold higher than “standard”. Mortality rate not was affected by embryo stage at biopsy moment ( $P>0.05$ ). Although sex ratio was significantly skewed to male embryos, differences were not observed among laboratories ( $P>0.05$ ) and breeds ( $P>0.05$ ) on sex ratio of IVP bovine embryos. In conclusion, IVP bovine embryo sexing can be utilized in large escale, accentuating that embryo viability after micromanipulation was influenced by embryo quality and biopsy procedure quality, with laboratories and bovine breeds not affecting sex ratio.

**Keywords:** Embryo sexing, Micromanipulation, In vitro fertilization, Embryo, Bovine, DNA.

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil ocupa atualmente posição destacada entre os países que aplicam comercialmente e em larga escala as diversas biotecnologias da reprodução animal. Desde a década de 70, quando a transferência de embriões (TE) foi iniciada, esta tecnologia foi progressivamente propagada, passando a ser cada vez mais utilizada pelos técnicos atuantes neste setor. Entretanto, foi a partir do ano 2.000 que se observou o expressivo crescimento da produção de embriões *in vitro*, o que fez com que o Brasil passasse a ser reconhecido como referência mundial na área de tecnologias de embriões. Nos últimos quatro anos, o Brasil foi responsável por aproximadamente 25% da produção total e 50% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (1).

O crescente desenvolvimento da produção de embriões *in vitro* proporcionou o avanço de biotecnologias paralelas à indústria de transferência de embriões. Neste contexto, as técnicas de micro-manipulação embrionária e de diagnóstico genético pré-implantacional passaram a ser utilizadas como importantes ferramentas, permitindo intensificar e acelerar ainda mais os processos de melhoramento genético dos animais de produção (2,3).

A identificação do sexo embrionário tem sido alvo de estudo de diversos grupos de pesquisadores desde os anos 80, período em diferentes métodos foram descritos, tais como: 1) utilização de antígeno H-Y no meio de cultivo embrionário

(4,5,8); 2) análises citogenéticas (6,7,9) e 3) hibridação *in situ* (FISH) (4,6). Entretanto, foi com o advento da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) que o procedimento de sexagem de embriões bovinos tornou-se viável e passou a ser utilizado por diferentes grupos.

Apesar da utilização da sexagem de embriões possuir grande aplicação na área da produção e reprodução de bovinos e, conseqüentemente, a maioria dos trabalhos terem sido desenvolvidos nesta espécie (4-36), existem alguns artigos científicos descrevendo o método de identificação do sexo embrionário em ovinos (37), caprinos (38), bubalinos (34,39,40), suínos (41), eqüinos (42) e felinos (43).

A metodologia de sexagem embrionária pode ser dividida basicamente em duas etapas: 1) micro-manipulação embrionária e 2) análise de DNA.

Nas ultimas décadas, diversos autores avaliaram as técnicas de micro-secção e micro-aspiração, utilizadas para a realização da biópsia de embriões bovinos (7,10-37), tanto em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Bredbacka (20) descreveu as duas principais técnicas para obtenção da biópsia embrionária, concluindo que apesar da micro-aspiração causar menores danos ao embrião e à zona pelúcida, a técnica de micro-secção é mais fácil de ser empregada pelos veterinários de campo.

Herr e Reed (10) relataram que a micro-manipulação embrionária para obtenção da biópsia não afetou o potencial de desenvolvimento dos embriões, indicando sua utilização a campo.

Thibier e Nibart (11), descreveram os aspectos logísticos e técnicos da aplicação da sexagem de embriões bovinos inserida em programa de transferência de embriões convencional na França. Os autores relataram baixa eficiência na identificação do sexo utilizando a técnica de micro-aspiração (51,0%) quando comparada com biópsias obtidas por micro-seção (94,7%) e acurácia de 98%. Deve-se tomar os devidos cuidados para evitar a contaminação por DNA bovino, salientaram os autores, lembrando que podem ocorrer falhas de amplificação da reação de PCR devido ao desequilíbrio dos componentes da reação (causado por grande volume de meio de micro-manipulação adicionado junto com a biópsia) ou devido à inativação da enzima “Taq polymerase” (causada por aumento da temperatura durante o transporte dos reagentes de PCR até o campo). Segundo os autores, a taxa do sexo embrionário foi significativamente desviada a favor dos machos (54,0%), mas não foi influenciada pelo estágio embrionário. A taxa de gestação de 833 embriões transferidos foi de 45,3%, salientando a diferença significativa entre embriões de qualidade 1 (53,0%) e de qualidade 2 (34,0%). Os autores finalizam o artigo destacando que a sexagem embrionária é importante para acelerar a obtenção de gerações com sexo desejado e diminuir despesas com receptoras, e apontando para a futura aplicação no contexto da produção de embriões *in vitro*.

Roschlau et al. (16) relataram a sexagem de 7.826 embriões bovinos produzidos *in vivo* durante 5 anos, na rotina de TE convencional na Alemanha. Os

resultados referentes a 1,5 anos apontaram 51,4% de machos e 48,6% de fêmeas, taxa de gestação de 55,6% e alta taxa de embriões grau 3 indeterminados (25,5%)

Shea (18) apresentou a aplicação em larga escala da sexagem de embriões inseridas no programa de TE em rebanhos leiteiros do Canadá de 1992 a 1997. Foram analisados 4.183 embriões, submetidos a três diferentes métodos de micro-manipulação, em que de 10 a 20% da massa celular de cada embrião foi removida. Maiores taxas de gestação foram obtidas com o método de micro-aspiração (50,0%), quando comparado com o realizado com micro-agulha de vidro ('needle') (45,0%) e com a micro-secção (44,0%). A taxa de embriões fêmeas foi de 46,0%, sendo observada diferenças significativas entre os anos (1992-1997), períodos (abril – setembro *versus* outubro – março), touros e qualidade embrionária. O estágio embrionário e os dados referentes à fêmea doadora não afetaram a taxa do sexo.

No Brasil, Garcia et al. (14) relataram taxa de gestação de 45,8% com embriões obtidos por coleta convencional e congelados em etileno glicol, após a realização de biópsia pela técnica de micro-aspiração, evidenciando a possibilidade de congelar embriões após o procedimento de sexagem, facilitando o manejo de receptoras em programas de TE.

Todos os trabalhos citados até esse período histórico foram realizados com embriões produzidos *in vivo* e obtidos por coleta convencional. Entretanto, em um

dos primeiros estudos visando avaliar a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à biópsia, Carbonneau et al. (15) submeteram embriões com sete dias de cultivo (blastocistos) à técnica de micro-secção (MS) e embriões com cinco dias de cultivo (12 a 16 blastômeros) à de micro-aspiração (MA). As duas técnicas (MS e MA) foram avaliadas quanto ao desenvolvimento embrionário após a biópsia (93,8% e 77,3%, respectivamente), à taxa de gestação (66,2% e 44,7%, respectivamente) e a eficiência da PCR (85,3% e 95,7%, respectivamente). Os autores concluíram que a micro-manipulação embrionária não alterou o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, observando ser possível obter boas taxas de gestação, especialmente com a utilização da técnica de micro-secção em blastocistos.

Alonso et al. (27) avaliaram a capacidade de desenvolvimento de mórulas e blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, submetidos à piezo-micromanipulação, observando que a taxa de eclosão dos blastocistos de qualidade 1 (98,0%) e de qualidade 2 (83,0%) foi significativamente maior do que das mórulas de qualidade 1 (65%) e de qualidade 2 (38,0%), concluindo que tanto o estágio quanto a qualidade embrionária podem influenciar a viabilidade dos embriões PIV submetidos à biópsia por micro-aspiração.

A aplicação da sexagem comercial de embriões bovinos PIV em larga escala foi reportada por Hasler et al. (25). Foram submetidos ao processo de sexagem 1.181 embriões, obtendo-se taxa de 53,0% de embriões machos. A taxa

de gestação com embriões de qualidade 1 foi de 48,8% e de qualidade 2 de 27,8%. A taxa de prenhez dos embriões biopsiados no estágio de mórula (3,6%) foi significativamente menor do que com blastocistos (52,5%).

Recentemente, variações tecnológicas ligadas a PCR têm sido desenvolvidas com a finalidade de otimizar e/ou simplificar o método tradicional.

Com objetivo de facilitar a utilização da sexagem embrionária a campo, Bredbacka et al. (12) desenvolveram a metodologia em que o resultado do teste de DNA pode ser visualizado com trans-iluminador ultravioleta diretamente nos tubos onde as amostras foram amplificadas, sem a utilização de eletroforese. Recentemente, Virta et al. (26) descreveram a metodologia para identificação do sexo de embriões por ensaio de discriminação alélica, utilizando sonda de DNA fluorogênica sexo específica.

Hirayama et al. (30,39) desenvolveram a técnica para sexagem de embriões bovinos e bubalinos através da amplificação de região Y-específica em condição isotermal denominada "Loop-mediated Isotermal Amplification" (LAMP).

O artigo publicado por Badr et al. (34) descreve o método para determinação do sexo de embriões bovinos e bubalinos por PCR em tempo real.

Chrenek et al. (22) utilizaram a técnica denominada "Primer Extension Pre-amplification" (PEP-PCR) com objetivo de pré-amplificar o DNA obtido na biópsia embrionária e possibilitar a realização de múltiplas análises genéticas.

Neste contexto, diversos trabalhos científicos têm apontado para as técnicas de amplificação total do genoma (do inglês: "Whole Genome Amplification" - WGA) como um método revolucionário no diagnóstico genético pré-implantacional (44-48). Segundo Spits et al. [45] a limitada quantidade de DNA genômico (gDNA) obtido na biópsia embrionária é um fator que restringe a aplicação de múltiplos testes moleculares.

Barker et al. (47) reportaram a utilização de dois métodos de WGA: amplificação por deslocamento múltiplo e a tecnologia "OmniPlex", seguidas pela análise de painel composto por 2.320 marcadores do tipo "Single Nucleotide Polimorphism (SNP)", observando aproximadamente 99,8% de concordância no resultado da genotipagem com gDNA e DNA amplificado.

Conforme Dekkers (49), nos últimos anos, os avanços na área da genética molecular proporcionaram a identificação de múltiplos genes ou marcadores genéticos associados a diversas características de interesse nos animais de produção, tais como precocidade sexual, ganho de peso, qualidade de carne, produção e qualidade de leite, resistência a parasitas, entre outras. Essas informações genéticas têm sido utilizadas em programas de seleção assistida por marcadores.

Com o objetivo de desenvolver metodologia que possibilite a aplicação da seleção assistida por marcadores em fases embrionárias, Alonso et al. (48) avaliaram a tecnologia "OmniPlex" aplicada em biópsias de embriões bovinos

produzidos *in vitro* como método de escolha para amplificação do gDNA. Após o procedimento de pré-amplificação, obteve-se concentração média final de  $5,7 \pm 1,9$   $\mu\text{g}$  de gDNA, concluindo que esta técnica pode ser utilizada em análises envolvendo pequena quantidade de material genético, como no diagnóstico genético pré-implantacional de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Os recentes avanços referentes às tecnologias de reprodução assistida (produção de embriões *in vitro*), acopladas às técnicas de diagnóstico genético pré-implantacional (micro-manipulação embrionária e WGA) e à seleção assistida por marcadores moleculares, constituirão importantes ferramentas para que em futuro próximo o processo de seleção genética seja aplicado em fases embrionárias precoces. De acordo com Chrenek et al. (22), a caracterização genética de embriões é o caminho mais rápido para obtenção de gerações com o genótipo desejado, possibilitando a redução entre intervalos de gerações e a diminuição de custos nos processos de melhoramento genético.

O objetivo desta dissertação foi avaliar a interferência de diferentes fatores (sexo, laboratório de produção *in vitro*, raça, estágio e qualidade embrionária e padrão da biópsia) sobre a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*, descrevendo a metodologia e o processo empregado na aplicação da sexagem embrionária em larga escala, no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- [1] VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Bovine embryo production in Brazil: a new cenário. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.35, n.3, p.920-924, 2007.
- [2] BAVISTER, B.D. Early history of in vitro fertilisation. **Reproduction**, New York, v.124, n.2, p.181-196, 2002.
- [3] FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRE, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, Hanover, v.59, n.X, p.125-138, 2003.
- [4] BETTERIDGE, K.J.; HARE, W.C.D.; SINGH, E.L. **Approaches to sex selection in farm animals**. In: Brackett BG, Seidel GE Jr., Seidel SM, (Eds), New technologies in animal breeding. New York: Academic Press 1981;109-125.
- [5] WACHTEL, S.S.; H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.19-28, 1984.
- [6] VAN VLIET, R.A.; VERRINDER GIBBINS, A.M.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: A review of current methods with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.421-438, 1989.

- [7] SCHRÖDER, A.; MILLER, J.R.; THOMSEN, P.D.; ROSCHLAU, K.; AVERY, B.; POULSEN, P.H.; SCHMIDT, M.; SCHWERIN, M.; Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, v.1, n.2, p.121-133, 1990.
- [8] RAMALHO, M.F.P.D-T.; GARCIA, J.M.; ESPER, C.R.; VANTINI, R.; ALVES, B.C.A.; ALMEIDA JUNIOR, I.L.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer antisera. **Theriogenology**, v.62, n.2, p.1569-1576, 2004.
- [9] KING, W.A. Sexing embryos by cytological methods. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.7-17, 1984.
- [10] HERR, C.M.; REED, K.C.; Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. **Theriogenology**, Hanover v.35, n.1p.45-54, 1991.
- [11] THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.71-80, 1995.
- [12] BREDBACKA, P.; KANKAANPÄÄ, A.; PEIPPO, J. PCR-Sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, v.44, n.1, p.176-176, 1995.
- [13] HOCHMAN, D.; ZARON, Y.; DEKEL, I.; FELDMESSER, E.; MEDRANO, J.F.; SHANI, M.; RON, M. Multiple genotype analysis and sexing of ivf bovine embryos. **Theriogenology**, v.46, n.1, p.1063-1075, 1996.

- [14] GARCIA, J.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; PUPIM, F.; PANTANO, T.; VISINTIN, JA. Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.268, 1997.
- [15] CARBONNEAU, G.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.266, 1997.
- [16] ROSCHLAU, K.; ROSCHLAU, D.; ROSELIUS, R.; DEXNE, U.; MICHAELIS, U.; STREHL, R.; UNICKI, P.; RINK, N. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.273, 1997.
- [17] AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; PESCHEL, D.E.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified ivp bovine embryos. **Theriogenology**, v.50, n.1, p.129-145, 1998.
- [18] SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.841-854, 1999.
- [19] HASSUN, P.A.; MELLO, M.R.B.; PORTO, L.P.C.; GARCIA, J.F. Bovine embryo sexing by primer extension preamplification polymerase chain reaction (PEP – PCR). **Theriogenology**, v.51, n.1, p.398, 1999.

- [20] BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.23-34, 2001.
- [21] LOPES, R.F.F.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. **Theriogenology**, v.56, n.1, p.1383-1392, 2001.
- [22] CHRENCK, P.; BOULANGER, L.; HEYMAN, Y.; UHRIN, P.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; RENARD, J.P. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.1071-1081, 2001.
- [23] PARK, J.H.; LEE, J.H.; CHOI, K.M.; JOUNG, S.Y.; KIM, J.Y.; CHUNG, G.M.; JIN, D.I.; IM, K.S. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.1843-1853, 2001.
- [24] GARCIA, J.F. Practical considerations of embryo manipulation preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, v.56, n.1, p.1393-1399, 2001.
- [25] HASLER, J.F.; CARDEY, E.; STOKES, J.E.; BREDBACKA, P. Nonelectrophoretic PCR- sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v.58, n.2, p.1457-1469, 2002.
- [26] VIRTA, J.; MARKOLA, J.; PEIPPO, J.; MARKKULA, M.; VILKKI, J. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. **Theriogenology**, v.57, n.2, p.2229-2236, 2002.

- [27] ALONSO, R.V.; WEPPERT, M.; GARCIA, J.F.; REICHENBACH, H.D. Effect of biopsy by piezo-micromanipulation on developmental capacity of in vitro produced bovine morulae and blastocysts. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, n.1, p.215, 2003.
- [28] ALVES, B.C.A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; TEIXEIRA, C.M.; MOREIRA-FILHO, C.A. Use of primers derived from a new sequence of the bovine y chromosome for sexing bos taurus and bos indicus embryos. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.1415-1419, 2003.
- [29] TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of in vivo- and in vitro-produced bovine embryos for their practical use. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.2, p.29-38, 2004.
- [30] HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; MORIYASU, S.; SAWAI, K.; ONOE, S.; TAKAHASHI, Y. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. **Theriogenology**, v.62, n.2, p.887-896, 2004.
- [31] KAGEYAMA, S.; YOSHIDA, I.; KAWAKURA, K.; CHIKUNI, K.; A novel repeated sequence located on the bovine y chromosome: its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. **Journal Veterinary Medical Science**, v.66, n.1, p.509-514, 2004.

- [32] ALMODIN, C.G.; MORON, A.F.; KULAY, L.; MINGUETTI-CÂMARA, V.C.; MORAES, A.C.; TORLONI, M.R. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**, v.84, n.2, p.895-899, 2005.
- [33] KAGEYAMA, S.; HIRAYAMA, H.; MORIYASU, S.; INABA, M.; ITO, D.; OHTA, H.; SAWAI, K.; MINAMIHASHI, A.; ONOE, S. Genetic diagnosis of band 3 deficiency and sexing in bovine preimplantation embryos. **Journal Veterinary Medical Science**, v.68, n.1, p.319-323, 2006.
- [34] BADR, H.; PUGLISI, R.; BONGIONI, G. A rapid method for sex determination of bovine and buffalo embryos by one step real-time PCR. **Atti 41° Congr. SIPZOO "From genome to proteome in animal science"**, Lodi, 2006.
- [35] LU, W.; RAWLINGS, N.; ZHAO, J.; WANG, H. Amplification and application of the HMG box of bovine SRY gene for sex determination. **Animal Reproduction Science** 2006; doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.08.023
- [36] KUBISCH, H.M.; JOHNSON, K.M. The effects of blastomere biopsy and oxygen tension on bovine embryo development, rate of apoptosis and interferon- $\tau$  secretion. **Reproduction Domestic Animals**, v.42, n. 1, p.509-515, 2007.

- [37] MARA, L.; PILICHI, S.; ANNA, A.; ACCARDO, C.; CHESSA, B.; DATTENA, M.; BOMBOI, G.; CAPPAL, P. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. **Molecular Reproduction and Development**, v.69, n.2, p.35-42, 2004.
- [38] SHI, L.; YUE, W.; REN, Y.; LEI, F.; ZHAO, J. Sex determination in goat by amplification of the HMG box using duplex PCR . **Animal Reproduction Science**, v.105, n.3-4, p.398-403, 2008.
- [39] HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; TAKAHASHI, Y.; MORIYASU, S.; SAWAI, K.; ONOE, S.; WATANABE, K.; KOJIYA, S.; NOTOMI, T.; MINAMIHASHI, A. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. **Theriogenology**, v.66, n.2, p.1249-1256, 2006.
- [40] FU, Q.; ZHANG, M.; QIN, W.S.; LU, Y.Q.; ZHENG, H.Y.; MENG, B.; LU, S.S.; LU, K.H. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. **Theriogenology**, v.68, n.2, p.1211-1218, 2007.
- [41] FONTANESI, L.; SCOTTI, E.; RUSSO, V. Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. **Molecular Reproduction and Development** 2008 (in press).
- [42] PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.44, n.1, p.619-627, 1995.

- [43] CIANI, F.; COCCHIA, N.; RIZZO, M.; PONZIO, P.; TORTORA, G.; AVALLONE, L.; LORIZIO, R. Sex determining of cat embryo and some feline species. **Zygote**, v.16, n.1, p.169-177, 2008.
- [44] HOLBROOK, J.F.; STABLEY, D.; SOL-CHURCH, K. Exploring Whole Genome Amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.16, n.1, p.125-133, 2005.
- [45] SPITS, C.; LE CAIGNEC, C.; DE RYCKE, M.; VAN HAUTE, L.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I.; SERMON, K. Optimization and evaluation of single-cell whole genome multiple displacement amplification. **Human Mutation**, v.27, n.5, p.496-503, 2006.
- [46] COSKUN, S.; ALSMADI, O. Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis. **Prenatal diagnosis**, v. 27,n.1, p.297-302, 2007.
- [47] BARKER, D.L.; HANSEN, M. S. T.; FARUQI, A. F.; GIANNOLA, D.; IRSULA, O. R.; LASKEN, M. L.; MAKAROV, A.; OLIPHANT, A.; PINTER, J. H.; SHEN, R.; SLEPTSOVA, I.; ZIEHLER, W.; LAI, ERIC. Genotyping across a 2320-SNP linkage panel two methods of Whole-Genome Amplification enable accurate. **Genome Research**. v. 14, n.1, p. 901-907, 2004.

- [48] ALONSO, R.V.; PERRI, S.H.V.; GARCIA, J.F. Preimplantation genetic diagnosis of bovine embryos using whole genome amplification. **Jornal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, v.13, n.4, p.951, 2007.
- [49] DEKKERS, J.C.M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. **Journal Animal Science**, v.82, n.2, p.313-328, 2004.

## **2. CAPÍTULO 2 - FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E A PROPORÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM PROGRAMA DE SEXAGEM COMERCIAL**

Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em programa de sexagem comercial.

Factors affecting the viability and sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos in commercial sexing program.

R.V. Alonso <sup>ab</sup>, J.A.A. Hellú <sup>bc</sup>, S.H.V. Perri <sup>a</sup>, J.A. Visintin <sup>d</sup>, J.F. Garcia <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup> Transfix – Transplante de Embriões Ltda, Patrocínio Paulista, São Paulo, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade de Franca, UNIFRAN, Franca, São Paulo, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, Brasil.

Endereços:

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, Rua Clóvis Pestana, 793, Jd. Dona Amélia, CEP: 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Tel: 55 18 3636-1365 - e-mail: [jfgarcia@terra.com.br](mailto:jfgarcia@terra.com.br)

<sup>b</sup> Transfix – Transplante de Embriões Ltda, Rua Lourival Faleiros, 1006, Centro, CEP: 14415-000, Caixa Postal 97, Patrocínio Paulista, São Paulo, Brasil.

Tel/Fax: 55 16 3145-1359 / 55 16 8135-5590 - e-mail: [transfix@terra.com.br](mailto:transfix@terra.com.br)

<sup>c</sup> Universidade de Franca, Av. Dr. Armando Salles de Oliveira, 201, Caixa Postal 82, Parque Universitário, CEP: 14.404-600, Franca, SP, Brasil. [produtosja@uol.com.br](mailto:produtosja@uol.com.br)

<sup>d</sup> Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP: 05508-270, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil. Tel/Fax: 55 11 818-7015/818-7412 – e-mail: [visintin@usp.br](mailto:visintin@usp.br)

## 2.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as interações de diferentes fatores (sexo, laboratório de produção in vitro, raça, estágio e qualidade embrionária e padrão da biópsia) sobre a taxa de mortalidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro (PIV) submetidos ao processo de sexagem, em larga escala. Foi utilizado banco de dados referente a 4.650 embriões bovinos PIV, submetidos à biópsia pela técnica de micro-aspiração e o DNA à reação em cadeia pela polimerase (PCR). Somente as fêmeas foram transferidas para receptoras sincronizadas. O diagnóstico de gestação e a sexagem fetal foram realizados por ultra-sonografia. A taxa de mortalidade após a biópsia foi de 10,3% e a taxa de gestação foi de 31,7%. A PCR revelou eficiência de 93,3%, acurácia de 93,2% e desvio da taxa de sexo a favor dos machos (52,9%) ( $P < 0,05$ ). De acordo com os valores do odds ratio, nos embriões de qualidade 2 e 3 a chance de ocorrer morte embrionária após a realização da biópsia foi 3,19 e 11,37 vezes maior, respectivamente, do que nos embriões de qualidade 1. Nos embriões cuja

biópsia foi classificada como “fora de padrão”, a chance de ocorrer mortalidade embrionária foi 3,6 vezes maior do que na biópsia “padrão”. A taxa de mortalidade não foi influenciada pelo estágio do embrião no momento da biópsia ( $P>0,05$ ). Não foram observadas influências de laboratórios ( $P>0,05$ ) e raças ( $P>0,05$ ) sobre a taxa do sexo de embriões bovinos PIV. Em conclusão, a sexagem de embriões bovinos PIV pode ser utilizada em larga escala, salientando-se que a viabilidade embrionária é influenciada pela qualidade do embrião e pelo padrão de execução da biópsia.

**Palavras-chave:** Sexagem embrionária; Micro-manipulação; Fertilização in vitro; Bovino; DNA.

## 2.2 Abstract

The present study aimed to evaluate the interactions among different factors (sex, in vitro produce laboratory, breed, stage and quality embryo and biopsy standard) on the viability and sex ratio of in vitro produced (IVP) bovine embryos, submitted to a large scale sexing program. A survey referring to 4.650 IVP bovine embryos submitted to the biopsy procedure by microaspiration technique, and DNA to the polymerase chain reaction (PCR). Only female embryos were transferred to synchronized recipients. Pregnancy diagnosis and fetal sex determination were carried out by ultrasound. Mortality rate of biopsied embryos

was 10.3% and pregnancy rate was 31.7%. The PCR showed 93.3% efficiency, 93.1% accuracy and sex rate skewed to male embryos 52.9% ( $P < 0,05$ ). According odds ratio value, for quality 2 and 3 embryo the mortality rate after biopsy was 3.19 and 11.37 fold higher, respectively, than for quality 1 embryo. Embryos whose biopsy was classified “non standard” the embryonic mortality rate was 3.6 fold higher than “standard”. Mortality rate not was affected by embryo stage at biopsy moment ( $P > 0.05$ ). Differences were not observed among laboratories ( $P > 0.05$ ) and breeds ( $P > 0.05$ ) on the sex ratio of IVP bovine embryos. In conclusion, IVP bovine embryo sexing can be utilized in large scale, accentuating that embryo viability after micromanipulation was influenced by embryo quality and biopsy procedure quality, with laboratories and bovine breeds not affecting the sex ratio.

**Keywords:** Embryo sexing; Micromanipulation; In vitro fertilization; *Bovine*; DNA.

### 2.3 Introdução

Segundo relatório apresentado pela “International Embryo Transfer Society” (IETS), o Brasil ocupa posição destacada entre os países que aplicam comercialmente e em larga escala as diversas biotecnologias da reprodução animal, tendo sido responsável por cerca de 200.000 transferências de embriões bovinos produzidos in vitro (PIV) em 2006, o equivalente a aproximadamente 50%% de todo movimento mundial [1]. Este crescente desenvolvimento da

produção de embriões *in vitro* proporcionou o avanço de biotecnologias paralelas à indústria de transferência de embriões a campo. Neste contexto, as técnicas de micromanipulação embrionária e de diagnóstico genético pré-implantacional são ferramentas importantes que permitem intensificar e acelerar o melhoramento genético de animais com alto valor zootécnico [2,3].

Nas últimas décadas, diversos autores avaliaram as técnicas de micro-seção e micro-aspiração, utilizadas para realização da biópsia de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* [4-25]. Herr e Reed [5] relataram que a micromanipulação embrionária para obtenção da biópsia não afetou o potencial de desenvolvimento dos embriões, indicando sua utilização a campo. Thibier e Nibart [5], Garcia et al. [8], Roschlau et al. [10] e Shea [11] apresentaram a aplicação a campo da tecnologia de micro-manipulação para sexagem de embriões produzidos *in vivo*.

Bredbacka [13] descreveu as duas principais técnicas utilizadas para obtenção da biópsia embrionária, concluindo que apesar da micro-aspiração causar menores danos ao embrião e à zona pelúcida, a técnica de micro-seção é mais fácil de ser empregada pelos veterinários de campo.

Carbonneau et al. [9] avaliaram a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à biópsia pela a técnica de micro-seção e de micro-aspiração, obtendo melhores resultados com a primeira.

Quanto aos diferentes métodos utilizados para a identificação do sexo de embriões bovinos, técnicas como a utilização de antígeno H-Y no meio de cultivo embrionário [26-29], análises citogenéticas [4,28,30] e hibridação in situ (FISH) [4,28] foram desenvolvidas. Entretanto, foi com o advento da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) que o procedimento de sexagem embrionária tornou-se viável e passou a ser utilizado por diversos grupos tanto na espécie bovina [4,6-17,19-22,24-28,30-37] quanto em outras espécies como ovinos [38], caprinos [18], bubalinos [37,39,43], suínos [40], eqüinos [41] e felinos [42].

Recentemente, novas tecnologias ligadas a PCR têm sido desenvolvidas com a finalidade de otimizar e/ou simplificar o método tradicional, tais como “Primer Extension Preamplification” (PEP-PCR) [12,20], PCR com sondas flourogênicas [35], “Loop-mediated Isothermal Amplification” (LAMP) [36-37] e PCR em tempo real [43].

Embora a sexagem de embriões seja um tema bastante explorado cientificamente, existem poucas publicações abordando a inserção desta tecnologia em programa comercial de transferência de embriões PIV, em larga escala [9,15].

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a influência de diferentes fatores sobre a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos PIV submetidos à micro-manipulação para a sexagem pela técnica de PCR, apresentando a metodologia e processo empregado na implantação desta

biotecnologia na rotina comercial de cinco laboratórios de produção in vitro no Brasil.

## **2.4 Material e Métodos**

### *2.4.1 Banco de dados*

Este trabalho foi desenvolvido a partir da análise do banco de dados da Transfix – Transplante de Embriões Ltda, Patrocínio Paulista, São Paulo, Brasil, empresa especializada na prestação de serviços em biotecnologia da reprodução animal. Foram avaliados 96 procedimentos de sexagem de embriões bovinos PIV, realizados em cinco diferentes laboratórios de produção in vitro (A, B, C, D e E) e seis raças bovinas (origem/aptidão): Nelore (*Bos indicus/corte*), Brahman (*Bos indicus/corte*), Girolando ( $\frac{1}{2}$  *Bos taurus* /  $\frac{1}{2}$  *Bos indicus/leite*), Simental (*Bos taurus/corte*), Jersey (*Bos taurus/leite*) e Holandês (*Bos taurus/leite*), no período de março de 2005 a dezembro de 2007. Além dos laboratórios e das raças, foram considerados neste trabalho as variáveis relacionadas ao sexo embrionário (macho, fêmea e indeterminado), estágio embrionário no momento da realização da biópsia (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido), qualidade embrionária (1, 2 e 3) e o padrão na execução da biópsia.

#### 2.4.2 *Aspiração folicular e produção in vitro*

Os embriões foram produzidos in vitro a partir de oócitos obtidos por sistema de aspiração folicular trans-vaginal, guiado por ultra-sonografia. Os oócitos aspirados foram avaliados e transportados até o laboratório, onde realizou-se as etapas de maturação, fertilização e cultivo embrionário in vitro de acordo com protocolo de cada laboratório.

#### 2.4.3 *Micro-manipulação embrionária*

A micro-manipulação embrionária foi realizada nos mesmos locais onde os embriões foram produzidos. Os embriões com desenvolvimento mais adiantado (blastocistos) foram biopsiados no sexto dia (D6) após a fertilização in vitro, enquanto que os embriões com desenvolvimento tardio (mórulas) foram mantidos no cultivo e biopsiadas no dia seguinte (D7).

Os embriões foram avaliados e selecionados de acordo com o estágio e qualidade, segundo as recomendações da IETS [44], e posteriormente transferidos isoladamente para gotas de micro-manipulação devidamente identificadas em placa de Petri (60 mm, Corning, NY, USA), formadas com 70  $\mu$ L do mesmo meio de cultura que fora utilizado, entretanto ajustando-se a concentração de macromoléculas (soro fetal bovino ou albumina sérica bovina) para 10%, quando necessário.

A biópsia foi realizada utilizando-se dois micro-manipuladores e dois micro-injetores mecânicos (MM Micromanipulator, NY, USA) adaptados a microscópio invertido (CK2, Olympus, Tokyo, Japan), sob aumento de 100 X. A técnica empregada foi a de micro-aspiração de células embrionárias, com auxílio de duas micropipetas: “holding” e micro-aspiração, fabricadas com capilares de borossilicato utilizando equipamento de estiramento computadorizado (Puller 773, Campden Instrument Limit, USA), Microforja (MF-9, Narishige, Tokyo, Japan) e esmerilhador (EG-40, Narishige). A micropipeta “holding” foi utilizada para posicionamento e imobilização do embrião, enquanto que a de micro-aspiração (diâmetro externo  $\cong 30 \mu\text{m}$  e diâmetro interno  $\cong 25 \mu\text{m}$ , ângulo da extremidade  $\cong 30^\circ$ ) foi utilizada para aspiração de células embrionárias viáveis. Quando foi possível a identificação e diferenciação do trofoblasto e do embrioblasto, o embrião foi posicionado de tal forma que fossem aspiradas células do trofoblasto (Figura 1). As micropipetas de micro-aspiração foram substituídas a cada biópsia, evitando o risco de contaminação.

Considerou-se “biópsia padrão” a micro-aspiração de 5 a 15% da massa celular embrionária viável (desprezando-se material proveniente de células extrusas e/ou degeneradas) e “fora do padrão” biópsia em que ocorreu micro-aspiração de mais de 15% da massa embrionária viável, comprometendo a qualidade morfológica do embrião.

Após realização da biópsia, as células aspiradas foram transferidas para tubo de polipropileno de 0,2 mL, (Axygen, Union city, USA) devidamente identificado, contendo 2  $\mu$ L de água ultrapura (Sigma).

Cada lote de embriões transferidos para placa de micro-manipulação foi composto por no máximo 10 embriões, evitando a permanência destes fora da estufa de CO<sub>2</sub> por mais de 30 min. Após a realização das biópsias, os embriões foram transferidos para gotas isoladas e identificadas com 50  $\mu$ l do mesmo meio de cultura utilizado anteriormente, cobertas com óleo mineral (Sigma Chemical, MO, USA) em placas de Petri (25mm, Corning). As placas foram retornadas para estufa de CO<sub>2</sub>, onde os embriões biopsiados foram cultivados durante 6 a 12 h, até o momento da reavaliação e envasamento para transferência.

#### *2.4.4 Reação em cadeia pela polimerase*

Em cada amostra de biópsia embrionária foram adicionadas 20  $\mu$ g de proteinase K (USB, Cleveland, Ohio, USA), e após centrifugação foram incubadas a 56 °C por 10 min, para lise das membranas celulares, seguida de 95 °C por 10 min, para inativação da proteinase K (USB). Os tubos foram resfriados a 4 °C no final do procedimento de lise, e então foram adicionados 20  $\mu$ L da solução de PCR do sistema de sexagem de embriões bovinos fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Cenargen, Brasília, Distrito Federal, Brasil), totalizando volume final de 25  $\mu$ L. Este sistema é constituído por

dois pares de oligonucleotídeos, sendo um responsável pela amplificação de região Y-específica ( $\cong$  220 pb) e outro pela região autossômica ( $\cong$  280 pb).

A PCR foi realizada em termociclador (MJ-96+, Biocycler) com 5 min de desnaturação a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C (30 seg), anelamento a 57 °C (1 min), extensão a 72 °C (30 seg) e extensão final a 72 °C por 5 min, sendo o tempo total de amplificação de aproximadamente 2,5 h. Para cada reação, foram incluídos: controle negativo sem amostra de DNA, uma amostra contendo DNA conhecido de macho e uma com DNA de fêmea (controle positivo).

#### 2.4.5 Eletroforese

Finalizada a amplificação, 10  $\mu$ L da amostra foram homogeneizados com 2  $\mu$ L de azul de bromofenol (Sigma) e depositados dentro do poço do gel de agarose a 2% (Pronadisa, Madrid, Spain) preparado com TBE (Tris-borate/EDTA electroforesis bufer) incluindo 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo (Gibco, NY, USA). O tempo de corrida da eletroforese horizontal foi de 30 min e a visualização do gel foi realizada com trans-iluminador ultravioleta (ECX-20.M, Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France). A amplificação dos dois fragmentos na mesma amostra revela embrião macho, enquanto a amplificação de um único fragmento autossômico (280pb) representa embrião fêmea. As amostras com ausência de amplificação foram classificadas como “indeterminado” (Figura 2). A eficiência da PCR foi

avaliada pela proporção dos embriões devidamente sexados (machos + fêmeas) em relação ao total submetido ao processo de sexagem.

#### *2.4.6 Viabilidade embrionária após a biópsia*

Após identificação do sexo e antes do envasamento para transferência, todos os embriões micro-manipulados foram reavaliados quanto ao estágio e qualidade de acordo com o manual da IETS [44], possibilitando a avaliação da viabilidade embrionária pela taxa de mortalidade dos embriões bovinos PIV submetidos à biópsia.

#### *2.4.7 Transferência dos embriões*

Como este trabalho foi desenvolvido na rotina comercial dos laboratórios de produção in vitro no Brasil, por interesses econômicos somente os embriões diagnosticados fêmeas foram envasados individualmente em palhetas de 250  $\mu$ L e transferidos para receptoras previamente sincronizadas. A avaliação da qualidade das receptoras foi baseada no escore corporal e qualidade do corpo lúteo, avaliado por palpação trans-retal e/ou ultra-sonografia.

#### *2.4.8 Diagnóstico de gestação e determinação do sexo fetal*

A taxa de gestação foi observada por meio de diagnóstico realizado por palpação trans-retal e/ou exame ultra-sonográfico (US) entre 40 e 60 d após a TE.

O diagnóstico do sexo embrionário obtido pela técnica de PCR foi comparado com a sexagem fetal realizada por ultra-sonografia entre 55 e 70 d, permitindo avaliar a acurácia da sexagem embrionária.

#### *2.4.9 Análises estatísticas*

A interferência dos fatores (sexo, laboratório de produção in vitro, estágio e qualidade embrionária e padrão da biópsia) sobre a taxa de mortalidade de embriões PIV submetidos à biópsia por micro-aspiração foi avaliada utilizando-se análise de regressão de acordo com o método de Hosmer-Lemeshow [45] com o procedimento logístico (PROC LOGISTIC) do programa computacional SAS [46]. Basicamente este método envolve cinco etapas: inicialmente análise univariada utilizando o teste qui-quadrado para verificar a associação entre cada uma das variáveis estudadas com a variável dependente; construção de um modelo completo utilizando todas as variáveis significativas na análise univariada; eliminação das variáveis não significativas do modelo completo e comparação do modelo reduzido com o modelo precedente para o ajuste do modelo (“backward elimination procedure”); avaliação das possíveis interações duplas de variáveis e avaliação do ajuste do modelo usando a estatística Hosmer-Lemeshow. As variáveis que apresentaram valor de P menor que 25% ( $P < 0,25$ ) na primeira etapa foram incluídas no modelo inicial. A modelagem continuou até que todos os efeitos

principais ou termos da interação fossem significativos de acordo com a estatística de Wald ( $P < 0,05$ ).

A interferência dos laboratórios de produção in vitro e das raças bovinas sobre a proporção do sexo foi avaliada pelo teste qui-quadrado de associação, considerando-as estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

O teste qi-quadrado para proporção 1:1 foi utilizado para verificar a ocorrência de desvio na proporção do sexo encontrado com relação ao esperado.

### **3. Resultados**

Foram sexados 4.650 embriões produzidos in vitro, dos quais foram transferidos 1.826 embriões sexados de fêmea, apresentando 579 prenhez (31,7%). A taxa de mortalidade nos embriões PIV submetidos à biópsia foi de 10,4% e a sexagem evidenciou desvio do sexo a favor dos machos (52,9% machos : 47,1% fêmeas) ( $P < 0,05$ ). Dos 4.650 embriões PIV submetidos à sexagem, 312 (6,7%) foram classificados como “indeterminados”, pois não foi possível identificar o sexo destes embriões. Desta forma, a eficiência da técnica de sexagem por PCR foi de 93,3%.

A comparação do sexo embrionário obtido pela PCR com o sexo fetal por ultra-som (US) revelou a confirmação de 93,1% fêmeas (539/579 onde PCR=US) e 6,9% machos (40/579 onde PCR≠US). Desta forma, a acurácia da sexagem de embriões bovinos PIV pela técnica de PCR foi de 93,1%.

O modelo múltiplo de regressão logística mostrou que a taxa de mortalidade dos embriões bovinos PIV submetidos à biópsia para sexagem pode ser influenciada pelo sexo embrionário, por diferentes protocolos laboratoriais usados na produção in vitro e, principalmente, pela qualidade embrionária e pelo padrão na execução da biópsia (Tabela 1).

Não foi observada influência do sexo sobre a taxa de mortalidade entre embriões machos e fêmeas ( $P>0,05$ ), entretanto a taxa de mortalidade dos embriões indeterminados foi maior ( $P<0,01$ ).

Os resultados indicaram que o laboratório de produção de embriões in vitro pode exercer influência ( $P<0,01$ ) sobre a taxa de mortalidade embrionária, sendo o laboratório D o que resultou em menor taxa de mortalidade. A taxa de mortalidade embrionária do laboratório A foi escolhida como referência devido ao grande número de embriões sexados (2.722) em relação aos demais laboratórios.

A qualidade embrionária no momento da execução da biópsia influenciou ( $P<0,001$ ) a taxa de mortalidade de embriões PIV submetidos à micro-aspiração, pois de acordo com o valor odds ratio, nos embriões de qualidade 2 e 3 a chance de ocorrer mortalidade embrionária após a realização da biópsia foi 3,19 e 11,37 vezes maior, respectivamente, do que nos embriões de qualidade 1.

O padrão de realização da biópsia também influenciou ( $P<0,001$ ) na taxa de mortalidade embrionária, pois nos embriões cuja biópsia foi classificada “fora de

padrão”, a chance de ocorrer mortalidade embrionária foi 3,6 vezes maior do que na biópsia “dentro do padrão”.

A taxa de mortalidade entre os diferentes estágios embrionários no momento da biópsia foi de 13,3% mórula (35/265), 10,9% blastocisto inicial (266/2450), 10,1% blastocisto (120/1191), 8,6% blastocisto expandido (61/706) e 7,9% blastocisto eclodido (3/38). Apesar do estágio embrionário ter sido incluído no modelo de regressão logística inicial ( $P < 0,25$ ), foi posteriormente excluído pelo modelo, mostrando não influenciar a taxa de mortalidade ( $P > 0,05$ ).

A avaliação dos cinco laboratórios de produção in vitro analisados neste trabalho sobre a taxa do sexo (machos) de embriões PIV apresentou: A 52,2% (1341/2568), B 54,5% (417/765), C 54,3% (363/668), D 49,6% (128/258) e E 59,5% (47/79), indicando não haver influência do laboratório sobre a taxa de sexo ( $P > 0,05$ ).

Com relação às seis raças bovinas avaliadas, as taxas de sexo (macho) obtidas foram: Nelore 53,1% (2049/3944), Girolando 53,5% (76/142), Simental 50,0% (39/78), Holandês 46,0% (29/63), Brahman 57,9% (33/57) e Jersey 46,3% (25/54), não havendo influência das raças sobre taxa de sexo ( $P > 0,05$ ).

#### 4. Discussão

O expressivo número de embriões PIV (4.650) e as diferentes variáveis avaliadas neste trabalho possibilitaram a análise da influência de diversos fatores ligados à implantação da sexagem embrionária na rotina comercial da produção in vitro de embriões bovinos.

Embora a sexagem de embriões seja utilizada a campo desde os anos 90, a maioria dos trabalhos publicados trata de embriões obtidos por coleta in vivo [6,8-11]. A aplicação a campo em larga escala da sexagem de embriões PIV foi reportada por Carbonneau et al. [9] e por Hasler et al. [15].

A maioria dos autores que trabalharam com a sexagem de embriões obtidos in vivo optou pela técnica de micro-secção para realização da biópsia embrionária [5,8-10,11]. Comparando as duas técnicas, Thibier e Nibart [5] obtiveram menor eficiência na sexagem de embriões com a técnica de micro-aspiração (51,0%) do que com a técnica de micro-secção (94,7%). A grande diferença na eficiência entre os métodos pode ter ocorrido por falha durante o procedimento de transferência da biópsia para o tubo de PCR no método de micro-aspiração. A utilização de meio de micro-manipulação com baixa concentração de macromoléculas pode favorecer a fixação das células aspiradas no interior da micropipeta de vidro e, conseqüentemente, diminuir significativamente a eficiência do diagnóstico por PCR [5]. No presente estudo optou-se pela técnica de micro-aspiração devido à habilidade e adaptação dos

técnicos para a fabricação das micropipetas (“holding” e biópsia) e execução da biópsia embrionária com auxílio de micro-manipuladores mecânicos. Devido às diferentes concentrações de soro fetal e BSA dos meios de cultura utilizados nos diferentes protocolos laboratoriais, o meio de micromanipulação foi ajustado para 10% de soro fetal, obtendo-se eficiência de aplicação satisfatória (93,3%).

Independente da técnica de micro-manipulação escolhida a habilidade do técnico na realização da biópsia determinará a destreza e velocidade com que o trabalho será executado. Neste artigo, o tempo médio para a realização da biópsia por micro-aspiração foi de 3 min, enquanto que com a técnica de micro-seção outros autores relataram levar de 4 [8] a 10 min [5].

Confirmando os resultados apresentados por diversos autores [5,10,18], a qualidade do embrião antes da realização da biópsia é um dos principais fatores que influenciam a viabilidade embrionária, sendo que a taxa de mortalidade aumenta progressivamente conforme piora a qualidade embrionária.

O estágio embrionário no momento da realização da biópsia não exerceu influência sobre a taxa de mortalidade embrionária. Entretanto, a maioria dos embriões foi micro-manipulada durante o estágio de blastocisto inicial (2450) e blastocisto (1191), pois há relatos de maior sensibilidade à micro-manipulação das mórulas quando comparadas aos blastocistos PIV [5,18].

Os dados apresentados revelaram que a biópsia executada fora do padrão estabelecido aumenta 3,6 vezes a chance do embrião morrer, confirmando que a

habilidade do técnico responsável pela realização da biópsia influencia significativamente a viabilidade do embrião, como descrito anteriormente [5,8].

A influência dos laboratórios de produção in vitro sobre a taxa de mortalidade dos embriões biopsiados pode estar relacionada com os diferentes protocolos e meios de cultivo utilizados, que refletem na velocidade de desenvolvimento, grau de compactação e qualidade dos embriões produzidos in vitro.

Nas amostras em que houve falha de amplificação, não foi visualizada nenhuma das duas bandas esperadas na eletroforese. Nestes casos os embriões foram classificados como “indeterminados”. A inibição da amplificação do DNA pode ocorrer devido à alteração da concentração dos componentes presentes na reação de PCR, provocado pelo grande volume de meio de micro-manipulação transferido para o tubo junto com a biópsia ou mesmo devido à qualidade da enzima “Taq polymerase” [5]. Outro fator que pode causar problemas de amplificação é a falha na transferência das células embrionárias para o tubo de PCR, ou mesmo a transferência de células extrusas e/ou degeneradas, com degradação de DNA. Este último caso normalmente ocorre quando embriões de qualidade 2 e 3 são biopsiados, o que poderia justificar alta taxa de mortalidade dos embriões indeterminados, quando comparado aos que tiveram o sexo devidamente identificado ( $P < 0,01$ ).

Apesar dos resultados deste trabalho não apontarem a interferência dos laboratórios de produção in vitro e das raças bovinas sobre a taxa do sexo dos embriões PIV ( $P > 0,05$ ), o teste  $\chi^2$  de aderência para proporção 1:1 apresentou desvio significativo a favor dos machos (52,9%), concordando com os dados apresentados por Hasler et al. (53,0%) [10].

Em conclusão, a sexagem de embriões bovinos PIV pode ser utilizada em larga escala na rotina dos laboratórios de produção in vitro, salientando-se que a viabilidade dos embriões submetidos à biópsia foi influenciada pela qualidade do embrião e pelo padrão da execução da biópsia e que não houve influencia dos laboratórios e das raças bovinas sobre a taxa do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro.

## **5. Agradecimentos**

Os autores agradecem a Yeda Watanabe (Vitrogen), Joaquim Mansano Garcia (TecGene), Walt Yamazaki (Bioembryo) e Hallin Bassit (FertVitro), responsáveis técnicos dos laboratórios de fertilização in vitro pela parceria e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e a Altair Martins do Carmo pelo auxílio na preparação do material e na realização dos trabalhos de campo.

## 6. Referências

- [1] Viana, JHM, Camargo, LSA. Bovine embryo production in Brazil: a new cenario. *Acta Scientiae Veterinarie*, 2007;3:920-924.
- [2] Bavister BD. Early history of in vitro fertilisation. *Reprod.* 2002;124:181-196.
- [3] Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferre LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 2003;59:125-138.
- [4] Schröder A, Miller JR, Thomsen PD, Roschlau K, Avery B, Poulsen PH, Schmidt M, Schwerin M. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Animal Biotechnology* 1990;1:121-133.
- [5] Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 1995;43:71-80.
- [6] Garcia LF, Nogueira MFG, Pupim F, Pantano T, Visintin JA. Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. *Theriogenology* 1997;47:268 (abstract).
- [7] Hassun PA, Mello MRB, Porto LPC, Garcia JF. Bovine embryo sexing by primer extension preamplification polymerase chain reaction (PEP – PCR). *Theriogenology* 1999;51:398 (abstract).
- [8] Bredbacka P, Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology* 2001;55:23-34.

- [9] Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 2001;56:1383-1392.
- [10] Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 2002;58:1457-1469.
- [11] Kageyama S, Yoshida I, Kawakura K, Chikuni K. A novel repeated sequence located on the bovine y chromosome: its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. *J. Vet. Med. Sci* 2004;66:509-514.
- [12] Kageyama S, Hirayama H, Moriyasu S, Inaba M, Ito D, Ohta H, Sawai K, Minamihashi A, Onoe S. Genetic diagnosis of band 3 deficiency and sexing in bovine preimplantation embryos. *J. Vet. Med. Sci* 2006;68:319-323.
- [13] Shi L, Yue W, Ren Y, Lei F, Zhao J. Sex determination in goat by amplification of the HMG box using duplex PCR. *Animal Reproduction Science* 2007; doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.004
- [14] Agca Y, Monson RL, Northey DL, Peschel DE, Schaefer DM, Rutledge JJ. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified ivp bovine embryos. *Theriogenology* 1998;50:129-145.
- [15] Chrenck P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Bulla J, Renard JP. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 2001;55:1071-1081.

- [16] Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI, Im KS. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 2001;55:1843-1853.
- [17] Garcia JF. Practical considerations of embryo manipulation preimplantation genetic typing. *Theriogenology* 2001;56:1393-1399.
- [18] Alonso RV, Weppert M, Garcia JF, Reichenbach HD. Effect of biopsy by piezo-micromanipulation on developmental capacity of in vitro produced bovine morulae and blastocysts. *ACTA Scientiae Veterinarie* 2003;31:215 (abstract).
- [19] Almodin CG, Moron AF, Kulay L, Minguetti-Câmara VC, Moraes AC, Torloni MR. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* 2005;84:895-899
- [20] Kubisch HM, Johnson KM. The effects of blastomere biopsy and oxygen tension on bovine embryo development, rate of apoptosis and interferon- $\tau$  secretion. *Reprod. Dom. Anim.* 2007;42:509-515.
- [21] Betteridge KJ, Hare WCD, Singh EL,. Approaches to sex selection in farm animals. In: Brackett BG, Seidel GE Jr., Seidel SM, (Eds), *New technologies in animal breeding*. New York: Academic Press 1981;109-125.

- [22] Wachtel SS, H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology* 1984;21:19-28.
- [23] Van Vliet RA, Verrinder Gibbins AM, Walton JS. Livestock embryo sexing: A review of current methods with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology* 1989;32:421-438.
- [24] Ramalho MFPD-T, Garcia JM, Esper CR, Vantini R, Alves BCA, Almeida Junior IL, Hossepian de Lima VFM, Moreira-Filho CA. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer antisera. *Theriogenology* 2004;62:1569-1576.
- [25] King WA. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 1984;21:7-17.
- [26] Hochman D, Zaron Y, Dekel I, Feldmesser E, Medrano JF, Shani M, Ron M. Multiple genotype analysis and sexing of ivf bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:1063-1075.
- [27] Alves BCA, Hossepian de Lima VFM, Teixeira CM, Moreira-Filho CA. Use of primers derived from a new sequence of the bovine y chromosome for sexing *bos taurus* and *bos indicus* embryos. *Theriogenology* 2003;59:1415-1419.
- [28] Tominaga K. Cryopreservation and sexing of in vivo- and in vitro-produced bovine embryos for their practical use. *Journal of Reproduction and Development* 2004;50:29-38

- [29] Lu W, Rawlings N, Zhao J, Wang H. Amplification and application of the HMG box of bovine SRY gene for sex determination. *Animal Reproduction Science* 2006; doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.08.023
- [30] Virta J, Markola J, Peippo J, Markkula M, Vilkki J. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. *Theriogenology* 2002;57:2229-2236.
- [31] Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T, Minamihashi A. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 2006;66:1249-1256.
- [32] Badr H, Puglisi R, Bongioni G. A rapid method for sex determination of bovine and buffalo embryos by one step real-time PCR. *Atti 41° Congr. SIPZOO "From genome to proteome in animal science", Lodi, 2006.*
- [33] Mara L, Pilichi S, Anna A, Accardo C, Chessa B, Dattena M, Bomboi G, Cappai P. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. *Molecular Reproduction and Development* 2004;69:35-42.
- [34] Fu Q, Zhang M, Qin WS, Lu YQ, Zheng HY, Meng B, Lu SS, Lu KH. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology* 2007;68:1211-1218.
- [35] Fontanesi L, Scotti E, Russo V. Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex

determination in pigs. *Molecular Reproduction and Development* 2008 (in press).

- [36] Peippo J, Huhtinen M, Kotilainen T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1995;44:619-627.
- [37] Ciani F, Cocchia N, Rizzo M, Ponzio P, Tortora G, Avallone L, Lorzio R. Sex determining of cat embryo and some feline species. *Zygote* 2008;16:169-177.
- [38] Stringfellow DA, Seidel S. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd ed., USA: IETS, Savoy, Illinois; 1998.
- [39] Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York, USA: Wiley; 1989.
- [40] SAS Institute Inc. *SAS OnlineDoc® 9.1.3*. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

## 7. Tabelas

Tabela 1  
Efeito de diferentes fatores sobre a taxa de mortalidade de embriões bovinos produzidos in vitro submetidos à biópsia por micro-aspiração.

Variável	Categoria	Mortalidade Embrionária (%)	Odds ratio	95 intervalo de confiança (%)	P
Sexo	Macho	217/2296 (9,4)	Referência		0,0002
	Fêmea	215/2042 (10,5)	1,18	0,96-1,45	
	Indeterminado	53/312 (17,0)	1,86	1,32-2,61	
Laboratório de produção de embriões in vitro	A	274/2722 (10,1)	Referência		0,0002
	B	101/816 (12,4)	1,32	1,03-1,70	
	C	89/745 (11,9)	1,21	0,93-1,57	
	D	11/284 (3,9)	0,31	0,17-0,58	
	E	10/83 (12,0)	1,26	0,64-2,52	
Qualidade Embrionária	1	308/3889 (7,9)	Referência		<0,0001
	2	156/718 (21,7)	3,19	2,57-3,95	
	3	21/43 (48,9)	11,37	6,12-21,13	
Qualidade da biópsia	Dentro do Padrão	448/4515 (9,9)	Referência		<0,0001
	Fora de Padrão	37/135 (27,4)	3,60	2,39-5,43	

Teste de razão de verossimilhanças = 212,5, 9 g.l.,  $P < 0,0001$

Teste de qualidade de ajuste de Hosmer-Lemeshow = 7,6, 7 d.f.,  $P = 0,37$  (modelo ajustado)

A, B, C, D e E – Diferentes laboratórios comerciais de produção de embriões bovinos in vitro

Dentro do Padrão = micro-aspiração de 5-15% da massa celular embrionária viável

Fora do Padrão = micro-aspiração de mais de 15% da massa celular embrionária viável, comprometendo a qualidade do embrião .

## 8. Figuras

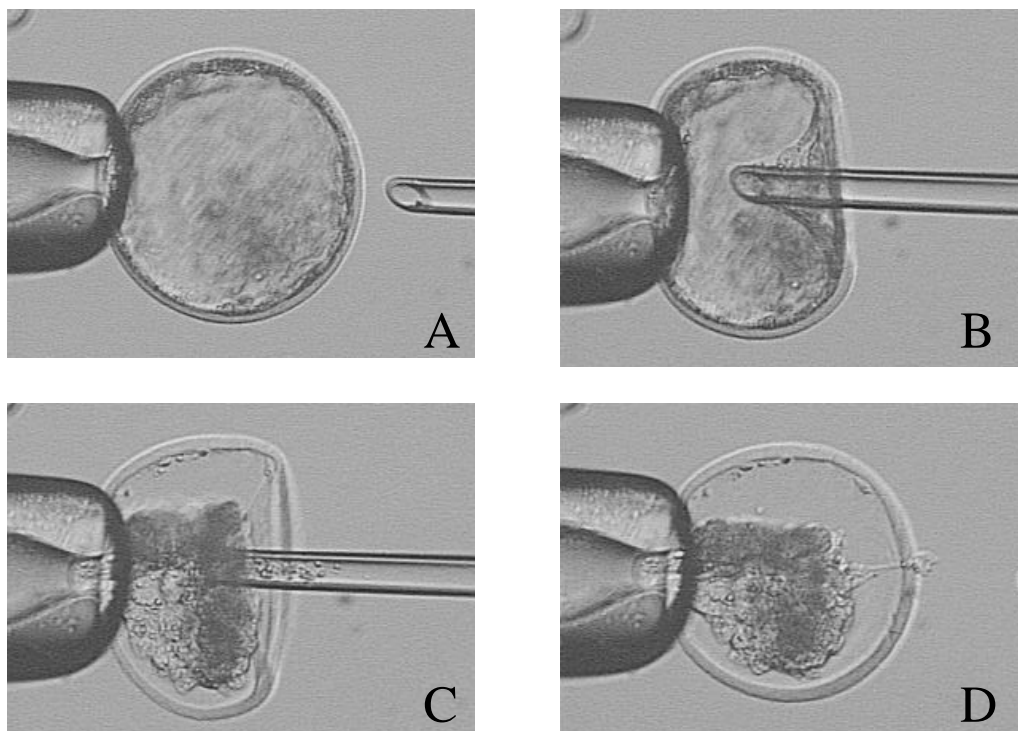


Fig. 1. Seqüência de micromanipulação pela técnica de microaspiração de blastocisto expandido bovino, produzido in vitro. Fixação e posicionamento do embrião através da micropipeta “holding” (A). Perfuração da zona pelúcida (B). Aspiração de 5 a 15% da massa celular viável, proveniente do trofoblasto (C). Embrião após realização da hiónsia (D)

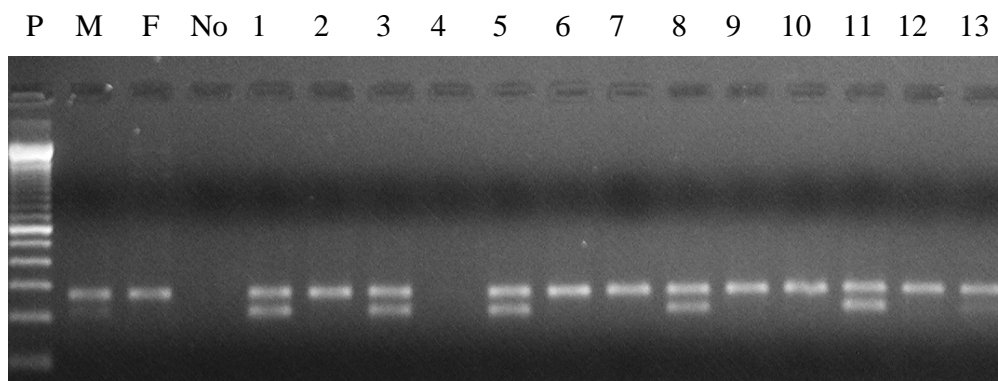


Fig 2. Padrão do gel de agarose obtido na sexagem de embriões bovinos produzidos in vitro, onde P indica o marcador de peso molecular (100bp, Gibco), M o controle positivo de macho, F o controle positivo de fêmea e No o controle negativo (sem amostra de DNA). Os embriões 1, 3, 5, 8, 11 e 13 foram sexados de macho e os embriões 2, 6, 7, 9, 10 e 12 de fêmea. O embrião 4 foi classificado como indefinido.

### 3. IMPLICAÇÕES

O trabalho apresentado nesta dissertação é fruto da linha de pesquisa iniciada pelo Prof. Dr. José Antônio Visintin durante orientação de doutorado do Prof. Dr. José Fernando Garcia, concluído em 1995, com o título “Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos”. Posteriormente, foram desenvolvidos outros trabalhos nesta mesma área de atuação, sob orientação de Garcia.

Rodrigo Vitório Alonso, autor desta dissertação, foi orientado de iniciação científica pelo Prof. Garcia, de 2001 a 2003, com o trabalho “Diagnóstico genético pré-implantacional em embriões bovinos pela técnica de PEP-PCR (“Primer Extension Preamplification - Polymerase Chain Reaction”). Durante estágio curricular realizado sob a orientação do Dr. Horst-Dieter Reichenbach, Alonso desenvolveu o trabalho “Effect of biopsy by piezo-micromanipulation on developmental capacity of in vitro produced bovine morulae and blastocysts”.

De 2004 a 2007, Alonso passou a desenvolver os trabalhos de sexagem de embriões a campo, em parceria com a Transfix – Tecnologia de Embriões Ltda, que culminou com o banco de dados analisados nesta dissertação.

A descrição da metodologia e do processo utilizado para a inserção da micro-manipulação embrionária na rotina dos laboratórios de produção de embriões in vitro, apresentados neste trabalho, abre recentes perspectivas para a utilização da seleção assistida por marcadores no processo de produção de embriões in vitro.

Nosso atual objetivo é desenvolver a metodologia de identificação de múltiplas características genéticas a partir da biópsia embrionária, disponibilizando a seleção de embriões com características desejáveis a campo possibilitando a transferência de embriões sexados e genotipados..