

Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por *Swim-up* ou Gradiente de Percoll

Maria Gabriela Tavares RHEINGANTZ¹;
Ligia Margareth Cantarelli PEGORARO²;
Odir Antonio DELLAGOSTIN¹;
Anita Mylius PIMENTEL¹;
Mari Lourdes BERNARDI³;
João Carlos DESCHAMPS¹

¹Instituto de Biologia e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS

²EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas - RS

³Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS

Resumo

No sistema de PIV em bovinos, tem sido obtida uma elevada porcentagem de embriões machos. Este experimento foi realizado para determinar se a presença de glicose no meio de cultivo afeta a proporção macho:fêmea (M:F) dos embriões bovinos PIV a partir da FIV com espermatozoides preparados pelos métodos do *swim-up* (S) ou do gradiente de Percoll (P). Após a MIV, os COCs foram divididos em dois grupos e inseminados com espermatozoides preparados por um dos métodos. Os zigotos foram cultivados em meio com ou sem 5,56mM de glicose, totalizando 4 tratamentos: S-Gli, S+Gli, P-Gli e P+Gli e 48h após a inseminação, os embriões de cada tratamento foram submetidos à sexagem por PCR (n=845). O efeito da glicose no meio de cultivo sobre a proporção M:F dos embriões PIV a partir dos dois métodos foi semelhante (teste do χ^2), resultando em uma porcentagem de machos menor do que 50% no estágio de 2-C (S: 30,8%; P: 23,8%; $P < 0,01$) e maior do que 50% no estágio de 8-C (S: 79,4%; P: 68,8%; $P < 0,01$). Estas porcentagens foram diferentes ($P < 0,05$) das observadas quando os embriões foram cultivados sem glicose, tanto no estágio de 2-C (S: 48,5%; P: 41,5%) como no de 8-C (S: 62,5%; P: 50,8%). A presença de glicose não afetou a proporção M:F no total de embriões produzidos (S: 56,7%; P: 49,0%), que foi semelhante à observada na ausência de glicose (S: 55,7%; P: 46,2%). Portanto, a glicose exacerbou a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os embriões machos e fêmeas.

Palavras-chave:

Fecundação *in vitro*.
Proporção macho:fêmea.
Glicose.
Gradiente de Percoll.
Swim-up.

Correspondência para:

MARIA GABRIELA TAVARES RHEINGANTZ
Departamento de Morfologia
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Pelotas
Avenida Duque de Caxias, 250
96030-002 - Pelotas - RS
mgrheing@ufpel.tche.br

Recebido para publicação: 01/07/2003
Aprovado para publicação: 25/03/2004

Introdução

Vários estudos têm reportado uma elevada proporção de machos entre os embriões mamíferos produzidos *in vitro*^{1,2,3,4,5}, o que poderia limitar a aplicação da técnica de PIV, sobretudo em rebanhos bovinos com aptidão leiteira.

Apesar das causas deste desvio ainda não estarem esclarecidas, há especulações de que as condições *in vitro* possam estar

relacionadas com este fenômeno.^{5,6,7,8} Alguns autores^{9,10} sustentam que os componentes do meio de cultivo podem influenciar a velocidade de desenvolvimento e/ou a sobrevivência dos embriões de determinado sexo, afetando assim a proporção macho:fêmea, devido a diferenças metabólicas ligadas ao sexo do embrião.

A glicose parece estar envolvida na ocorrência do desvio na proporção macho:fêmea resultante da diferente

velocidade de desenvolvimento entre os sexos¹¹. Nas primeiras horas após a fecundação, embriões bovinos do sexo masculino clivam mais rapidamente do que os do sexo feminino, quando cultivados em meio contendo 5,56 mM de glicose^{12,13,14}. Tiffin et al.¹⁵ constataram que o metabolismo da glicose é significativamente maior em embriões bovinos do sexo masculino do que nos do sexo feminino.

A presença de radicais de oxigênio no meio de cultivo também parece participar do mecanismo que determina este desvio macho:fêmea relacionado com a velocidade de desenvolvimento. Estes radicais, embora apresentem ação citotóxica, possuem também efeito estimulante sobre o desenvolvimento dos embriões¹⁶ e são encontrados em níveis mais baixos nos embriões fêmeas do que nos machos.¹⁷

O efeito dos métodos de preparação dos espermatozoides para FIV e das condições de cultivo sobre a proporção macho:fêmea dos embriões produzidos *in vitro* ainda é pouco conhecido. Em estudos recentes, foi constatado que o método *swim-up* resultou em maior proporção de machos entre embriões bovinos produzidos *in vitro*, enquanto o gradiente de Percoll não determinou desvios na proporção macho:fêmea.^{18,19}

O presente trabalho teve como objetivo determinar se a presença de glicose no meio de cultivo afeta a proporção macho:fêmea dos embriões bovinos produzidos *in vitro* resultantes da fecundação *in vitro* com espermatozoides preparados pelos métodos *swim-up* ou gradiente de Percoll.

Materiais e Métodos

Colheita dos oócitos e maturação *in vitro*

Ovários bovinos foram colhidos em frigoríficos e transportados até o laboratório em solução de NaCl a 0,9%, a 22°C. Os folículos com 2-8 mm de diâmetro foram aspirados para obtenção dos complexos

oócitos-*cumulus* (COC). Foram utilizados somente oócitos que possuíam três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus* não expandidas e que não apresentavam degeneração citoplasmática visível na avaliação morfológica.

A maturação dos oócitos foi realizada em TCM-199/25 mM hepes (Gibco) com 10% SFB (Gibco), 0,01 UI/mL rFSH (Gonal F-75), 5 mg/mL LH, 0,05 mg/mL sulfato de estreptomicina e 0,065 mg/mL penicilina G potássica. Os oócitos selecionados foram incubados neste meio por 22 a 24 horas, em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade relativa acima de 90%.

Após o período de maturação, os oócitos foram transferidos para o meio de fecundação IVF-TALP²⁰, em grupos de 25 a 50 oócitos em 400 mL de meio, onde foram imediatamente inseminados com espermatozoides preparados por um dos métodos descritos a seguir. O dia da inseminação foi considerado como dia zero (D0). Todos os reagentes químicos utilizados foram da Sigma, com exceção dos produtos indicados.

Preparação dos espermatozoides e fecundação *in vitro* (FIV)

Para a FIV, foi utilizado sêmen bovino de um único ejaculado congelado em palhetas de 0,5 mL, que foi descongelado imediatamente antes de sua utilização, em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Em cada dia de FIV, os oócitos maturados *in vitro* foram aleatoriamente divididos em dois grupos: um grupo foi inseminado com espermatozoides preparados pelo método do *swim-up*, conforme Parrish *et al.*²¹ e o outro foi inseminado com espermatozoides preparados pelo método do gradiente de Percoll.²² Foi descongelada uma palheta de sêmen por dia de FIV e o seu conteúdo dividido entre os dois tratamentos, que foram realizados simultaneamente. A concentração de espermatozoides utilizada para a inseminação foi de 10⁶

espermatozoides/ μL . Os gametas foram incubados durante 18 a 22 horas a 38,5°C, em estufa com 5% de CO₂ em ar e umidade relativa acima de 90%.

Cultivo dos zigotos

Após o período de FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos ao vórtex por 2 minutos, para a remoção das células do *cumulus* e dos espermatozoides aderidos. Logo após, os presumíveis zigotos de cada grupo foram lavados três vezes em meio SOFaa e então divididos aleatoriamente e transferidos para gotas de 400 μL de meio SOFaa²³ com 3 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina), com ou sem a presença de 5,56 mM de glicose. As gotas de meio de cultivo foram cobertas com óleo mineral. Os zigotos foram cultivados em estufa a 38,5°C, com 5% CO₂ em ar e umidade relativa acima de 90%. No segundo dia após a inseminação (D2), os embriões clivados de cada tratamento foram classificados morfológicamente em 2-células (2-C), 4-células (4-C) e 8-células (8-C), e preparados para a sexagem.

Preparo dos embriões para a sexagem

Após a avaliação, os embriões foram colocados em solução de pronase a 0,25% para remoção da zona pelúcida, evitando assim possível contaminação com DNA de espermatozoides que permaneceram ligados à zona pelúcida. A seguir, os embriões foram lavados quatro vezes em solução de PBS e então submetidos ao tratamento de lise com proteinase K (Gibco), onde cada embrião foi transferido para um tubo eppendorf contendo 20 μL de tampão de lise (150 mg/mL proteinase K, 15 mM Tris-HCl pH 8,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100), que foi incubado a 37°C por 60 minutos. A seguir, os tubos foram incubados a 95°C por 15 minutos, para inativação da proteinase K e armazenados a -20°C, até o momento da sexagem.

Sexagem dos embriões

Os embriões foram sexados pelo método de PCR, com a utilização de dois pares de *primers* (Genosys), simultaneamente. O primeiro par, reconhece uma seqüência autossômica específica de bovinos, o DNA satélite 1.715, que é amplificada tanto em fêmeas como em machos bovinos²⁴. O segundo par, reconhece uma seqüência repetitiva específica do cromossomo Y bovino amplificada somente em machos bovinos.^{24,25,26,27} O produto da amplificação com os *primers* DNA bovino-específicos possui 216 pb e o produto da amplificação com os *primers* cromossomo Y-específicos possui 175 pb.

No momento da sexagem, os tubos contendo as amostras (lisados de embriões) foram descongelados à temperatura ambiente. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 30 μL , utilizando como *templates* 10 μL de cada amostra. Todas as amplificações foram realizadas em um tampão com uma concentração final de 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1U/amostra Taq DNA polimerase (Gibco), 20 nM primers 1+2 e 20 nM primers 3+4.

As amostras foram amplificadas em um termociclador, sendo desnaturadas a 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos consistindo de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (56°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto). Após o último ciclo, todas as amostras foram incubadas por mais 10 minutos a 72°C.

A cada processamento, foram incluídos um controle negativo (amostra sem DNA), um controle positivo-fêmea (amostra com DNA de fêmea bovina) e um controle positivo-macho (amostra com DNA de macho bovino), para excluir contaminantes e checar a validade dos reagentes.

Análise dos produtos do PCR

Os produtos da amplificação por PCR (15 μL) foram submetidos à eletroforese em

gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio e analisados sob luz ultravioleta.

As amostras que apresentaram apenas o produto com 216 pb foram consideradas do sexo feminino. As amostras que apresentaram o produto com 175 pb, específico do cromossomo Y, além do produto com 216 pb, foram consideradas do sexo masculino.

Delineamento experimental e análise estatística

Foram realizados 4 tratamentos, em 10 repetições, sendo avaliado o efeito de dois métodos de preparação dos espermatozoides para FIV e da presença ou não de glicose no meio de cultivo dos zigotos, da seguinte forma: T1: *swim-up* + cultivo com 5,56mM de glicose; T2: *swim-up* + cultivo sem glicose; T3: Percoll + cultivo com 5,56mM de glicose e T4: Percoll + cultivo sem glicose.

Os dados foram analisados pelo teste do χ^2 (Qui-quadrado), sendo a proporção macho:fêmea em cada tratamento comparada com aquela teoricamente esperada de 1:1. A proporção macho:fêmea entre os tratamentos também foi comparada.

Resultados

Neste experimento, dos 879 embriões que foram submetidos ao PCR, 845 (96,1%) apresentaram amplificação para os primers

autossômicos bovino-específicos. Destes, 439 (52%) também mostraram amplificação da seqüência Y-específica.

Os resultados são apresentados na tabela 1. Quando os dois métodos de seleção de espermatozoides foram comparados, não apresentaram diferença significativa, dentro de cada estágio, tanto na presença como na ausência de glicose. Quando foi considerado o número total de embriões, foi verificado, na ausência de glicose, um maior percentual de machos com o *swim-up* ($P < 0.05$) do que com o Percoll.

Comparando a proporção de machos com a frequência esperada de 50%, dentro de cada estágio de desenvolvimento, a presença de glicose no meio de cultivo resultou em uma porcentagem menor do que 50% de embriões do sexo masculino no estágio de 2-células ($P < 0,01$) e maior do que 50% no estágio de 8-células ($P < 0,01$), tanto para *swim-up* como para Percoll. Na ausência de glicose, foi observada uma porcentagem maior do que 50% de embriões do sexo masculino somente no estágio de 8-células ($P < 0,05$) e com o método *swim-up*. Com o Percoll, não houve desvios na proporção dos sexos, em nenhum estágio, na ausência de glicose. Considerando o total de embriões, houve tendência a uma maior proporção de embriões do sexo masculino, com o *swim-up*, tanto na presença como na ausência de glicose ($P < 0,10$). Com os dois métodos de

Tabela 1

Proporção de machos entre embriões bovinos produzidos *in vitro* (dia 2) a partir de dois métodos de preparação dos espermatozoides e cultivados com ou sem glicose

Estágio do desenvolvimento	N.º de machos/total de embriões (% machos)			
	Com glicose		Sem glicose	
	<i>Swim-up</i>	Percoll	<i>Swim-up</i>	Percoll
2-C	20/65 (30,8) ^{Aa**}	15/63 (23,8) ^{Ca***}	32/66 (48,5) ^B	27/65 (41,5) ^D
4-C	45/77 (58,4) ^b	42/79 (53,2) ^b	45/81 (55,6)	38/82 (46,3)
8-C	54/68 (79,4) ^{Ac***}	44/64 (68,8) ^{Cb**}	45/72 (62,5) ^{B*}	32/63 (50,8) ^D
Total	119/210 (56,7) ⁺	101/206 (49,0)	122/219 (55,7) ^{+E}	97/210 (46,2) ^F

Diferente dos 50% esperados: + ($P < 0,10$); * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$).

Diferença ($P < 0,05$), na linha, entre presença e ausência de glicose com o método *swim-up*^{A,B} e Percoll^{C,D}.

^{E,F} Diferença, na linha, entre *swim-up* e Percoll ($P < 0,05$).

^{a,b,c} Diferença, na coluna, entre os estágios de desenvolvimento ($P < 0,01$).

seleção dos espermatozoides, a diferença na proporção de machos entre os estágios mais avançados e menos avançados só ocorreu na presença de glicose.

Com ambos os métodos de seleção dos espermatozoides, foi observado que a presença de glicose determinou uma porcentagem de machos significativamente maior do que a ausência de glicose, entre os 1 embriões mais adiantados ($P < 0,05$) e uma porcentagem de machos significativamente menor entre os embriões mais atrasados ($P < 0,05$), indicando uma diferença acentuada na velocidade de desenvolvimento entre embriões machos e fêmeas.

Discussão

A diferente velocidade de desenvolvimento entre os sexos, apesar de resultar em uma maior proporção de machos entre os embriões mais desenvolvidos, não necessariamente resulta em desvio na proporção macho:fêmea no número total dos embriões, o que já foi observado em bovinos^{2,12,28,29} e ovinos³⁰. No presente estudo, o aumento significativo no percentual de machos no estágio 8-C, na presença de glicose, tanto para o método Percoll como para *swim-up*, mostra que a glicose exacerbou a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os embriões machos e fêmeas.

O metabolismo total da glicose é o dobro em embriões bovinos machos do que nos fêmeas, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento mais rápido dos embriões machos.¹⁵ A elevada concentração de glicose no meio de cultivo (=5,56mM) pode contribuir para determinar a maior velocidade de desenvolvimento *in vitro* dos embriões bovinos machos, desde as primeiras clivagens.^{10,12,13,28}

O efeito da glicose na velocidade de desenvolvimento pode ser devido ao estímulo na formação de radicais de oxigênio, que se encontram em níveis baixos nos embriões fêmeas como resultado do controle glicose-dependente das enzimas HPRT e G6PDH, ligadas ao cromossomo X, que são super-

expressadas antes da inativação de um dos cromossomos X.^{12,28} Esta suposição é reforçada pela constatação de que a expressão dos genes HPRT e G6PDH é significativamente maior nos embriões bovinos fêmeas do que nos machos³¹. A concentração elevada de glicose no meio de cultivo (4,5 mM), assim como uma elevada tensão de oxigênio na atmosfera gasosa (20%), aumenta a geração de radicais de oxigênio derivados das reações xantina oxidase-hipoxantina (XOD-HXT)³². No presente experimento, assim como nos experimentos de Peippo e Bredbacka¹³ e Bredbacka e Bredbacka^{12,28}, foram utilizadas altas concentrações de glicose no meio de cultivo (5,56 mM) e de oxigênio na atmosfera (20%), as quais podem ter conduzido a um aumento dos radicais livres de oxigênio no meio de cultivo. A alta tensão de oxigênio, superior à existente no oviduto bovino, que é de 5%¹⁶, poderia por si só ter induzido a produção de radicais livres de oxigênio, resultantes das reações XOD-HXT, mesmo na ausência de glicose. Estes radicais poderiam ser suficientes para determinar o estresse oxidativo que aceleraria o desenvolvimento dos embriões machos, o qual seria exacerbado pelo incremento das reações XOD-HXT, na presença de glicose. Nos embriões fêmeas, a presença de glicose levaria à super-expressão das enzimas G6PDH e HPRT, ligadas ao cromossomo X, reduzindo a sua produção de radicais de oxigênio até níveis anormalmente baixos, talvez até atrasando o seu desenvolvimento.^{12,28}

Embora as diferenças não tenham sido significativas, percebe-se um aumento gradativo no percentual de machos, à medida que avança o estágio de desenvolvimento, mesmo na ausência de glicose no meio de cultivo (Tabela 1), o que pode indicar que a mesma não é o único fator envolvido neste processo. Esta constatação discorda da reportada por outros autores^{12,13,28}, os quais atribuem o desenvolvimento mais rápido dos embriões machos somente à presença de glicose exógena no meio de cultivo.

A expressão de genes ligados ao

cromossomo Y, como o SRY e/ou o ZFY, desde as primeiras clivagens foi constatada em diferentes espécies mamíferas^{33,34,35,36,37} e sua participação na aceleração do desenvolvimento dos embriões machos não pode ser descartada. Genes ligados ao cromossomo Y podem ter um efeito “acelerador” em machos e os dois cromossomos X ativos podem ter um efeito “retardador” em fêmeas, durante o período pré-implantação.³⁶ A detecção da transcrição em estágios tão precoces como 2-células, em embriões bovinos produzidos *in vitro*^{38,39}, pode ser um indício de que as condições *in vitro* são capazes de alterar a transcrição de um ou mais genes que afetam o desenvolvimento embrionário precoce.

Já foi constatado que os espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y apresentam diferenças na habilidade em fecundar os oócitos, talvez devido a diferenças na motilidade, tempo de viabilidade ou nos processos de capacitação e reação do acrossoma.⁴⁰ Alguns produtos gênicos ou proteínas carregados pelo espermatozoide portador do cromossomo Y e liberados no momento da fecundação, também podem determinar a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os sexos. Tais produtos gênicos poderiam induzir a transcrição de outros genes, exclusivamente em embriões machos.⁴¹

No presente trabalho, foi observado

que, na ausência de glicose, obteve-se um maior percentual de embriões machos quando foi utilizado o método do *swim-up* do que com o método do Percoll, considerando-se o número total de embriões produzidos, confirmando observações anteriores, de que o *swim-up* favorece a seleção de um maior número de espermatozoides portadores do cromossomo Y, determinando a produção de um maior percentual de embriões do sexo masculino.^{18,19} Este aspecto pode ter implicações práticas no momento da escolha do método de seleção de espermatozoides para PIV, quando deve ser considerado que um desvio na proporção de machos pode ocorrer nos estágios mais avançados de desenvolvimento, sobretudo quando os espermatozoides são selecionados pelo método do *swim-up* e o cultivo dos zigotos é efetuado na presença de glicose.

A presença de glicose no meio de cultivo não afetou a proporção M:F no total dos embriões produzidos a partir do *swim-up* ou do Percoll mas determinou, com ambos os métodos, desvios na proporção M:F, com uma maior porcentagem de machos entre os embriões de desenvolvimento mais adiantado (rápidos) e uma menor porcentagem de machos entre os embriões de desenvolvimento mais atrasado (lentos). Portanto, a glicose exacerbou a diferença na velocidade de desenvolvimento entre os embriões machos e fêmeas.

Abstract

In the bovine IVP system, it has been obtained a high percentage of male embryos. This experiment was carried out to determine if the glucose presence in the culture medium affects the sex ratio of bovine embryos IVP from the IVF with spermatozoa prepared for the swim-up (S) or Percoll gradient (P) methods. After the IVM, the COCs had been divided in two groups and inseminated with spermatozoa prepared for one of the methods. The zygotes had been cultivated in medium with or without 5.56mM of glucose, totalizing 4 treatments: S-Glu, S+Glu, P-Glu and P+Glu, and 48h post-insemination, the embryos of each treatment had been sexed for the PCR method (n=845). The effect of glucose in the culture medium on sex ratio of embryos IVP from the two methods was similar (χ^2 test), resulting in a percentage of males lower than 50% in the 2-C stage (S: 30.8%; P: 23.8%; $P < 0.01$) and higher than

Key-words

In vitro fertilization.
Sex ratio.
Glucose.
Percoll gradient.
Swim-up.

50% in the 8-C stage (S: 79.4%; P: 68.8%; $P < 0.01$). These percentages were different ($P < 0.05$) of the observed when the embryos were cultivated without glucose, as much in the 2-C stage (S: 48.5%; P: 41.5%) as in the 8-C stage (S: 62.5%; P: 50.8%). The glucose presence did not affect the sex ratio in the total of produced embryos (S: 56.7%; P: 49.0%), that was similar to the observed in the glucose absence (S: 55.7%; P: 46.2%). Therefore, the glucose exacerbated the difference in the development speed between the female and male embryos.

Referências

1. AVERY, B.; JORGENSEN, C. B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 265-270, 1992.
2. CARVALHO, R. V.; DEL CAMPO, M. R.; PALASZ, A. T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R. J. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. **Theriogenology**, v. 45, p. 489-498, 1996.
3. KING, W.A. et al. The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 779-788, 1991.
4. MARQUANT-LE-GUIENNE, B. et al. DNA probe sexing of young *in vitro* fertilized bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 253, 1992.
5. PEGORARO, L. M. C. et al. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts cocultured with bovine oviduct epithelial cells or Vero cells. **Theriogenology**, v. 49, p. 1579-1590, 1998.
6. GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2001.
7. KOCHHAR, H. P. S.; PEIPPO, J.; KING, W. A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v. 55, p. 3-14, 2001.
8. MARQUANT-LE-GUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocysts production in the bovine. **Theriogenology**, v. 49, p. 3-11, 1998.
9. GRISART, B. et al. The sex ratio of bovine embryos produced *in vitro* in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. **Theriogenology**, v. 43, p. 1097-1106, 1995.
10. YADAV, B. R. Relationship between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 434-439, 1993.
11. GUTIÉRREZ, A. et al. Influence of micromanipulation and *in vitro* culture in the sex dependent loss of embryos. In: RÉUNION A.E.T.E., 9., Lyon, 1993. **Proceedings...** p. 206.
12. BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Sex-related cleavage rate difference in bovine embryos produced *in vitro* is controlled by glucose. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 191, 1996.
13. PEIPO, J.; BREDBACKA, P. Male bovine zygotes cleave earlier than female zygotes in the presence of glucose. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 187, 1996.
14. PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2001.
15. TIFFIN, G. et al. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **Journal Reproduction of Fertility**, v. 93, p. 125-132, 1991.
16. RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 75-93, 1992.
17. PEIPO, J.; BREDBACKA, P. Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 56-61, 1995.
18. PEGORARO, L. M. C. et al. Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 751, 2002.
19. RHEINGANTZ, M. G. T. et al. Effect of sperm preparation method on sex ratio from *in vitro* bovine produced embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000 Estocolmo, Suécia. **Proceedings...**, v. 2, p. 176.
20. PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.
21. PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
22. AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 30, p. 147-153, 1989.
23. SAEKI, K. et al. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. **Theriogenology**, v. 34, p. 1035-1039, 1990.
24. TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v. 37, p. 963-978, 1992.
25. ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. Nucleic acid probes

- for prenatal sexing. International application published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) World Intellectual Property Organization. Publication No. WO 86/07095, 1986.
25. BONDOLI, 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**, v. 31 n. 1, p. 95-104, 1989.
26. ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. Nucleic acid probes for prenatal sexing. U.S. Patent No. 4 769 319, 1988.
27. ELLIS, S. B. et al. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 242, 1988.
28. BREDBACKA, K.; BREDBACKA, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 169-172, 1996.
29. XU, K. P.; YADAV, B. R.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 249-252, 1992.
30. BERNARDI, M. L.; DELOUIS, C. Sex-related differences in developmental rate of in-vitro matured/ in-vitro fertilized ovine embryos. **Human reproduction**, v. 11, p. 621-626, 1996.
31. GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female *in vitro*-produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 146-151, 2000.
32. IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/IVF bovine embryos (>4 cell) *in vitro* under certain culture conditions. **Theriogenology**, v. 51, n. 3, p. 613-622, 1999.
33. AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 30, p. 147-153, 1989.
34. BERNARDI, M. L. et al. Transcription of Y- and X-linked genes in preimplantation ovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 132-138, 1996.
35. BURGOYNE, P. S. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. **Development**, v. 117, p. 341-345, 1993.
36. GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, p. 246-250, 1997.
37. ZWINGMAN, T. et al. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 814-817, 1993.
38. PLANTE, L. et al. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 375-383, 1994.
39. VIUFF, D. et al. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 171-179, 1996.
40. GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Zygote**, v. 7, p. 37-43, 1999.
41. RAY, P.F. et al. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following *in vitro* fertilization. **Journal Reproduction of Fertility**, v. 104, p. 165-171, 1995.