

PROPORÇÃO SEXUAL DE EMBRIÕES BOVINOS PIV 60 D APÓS TETF DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INOVULADO¹

BRUNA ALVES ORTLIBAS², GUSTAVO BORTOLUCCI MUNIZ², HALIM ATIQUE NETTO², RODOLFO BILACHI PRADO², TÁBATA SALUM CALILLE ATIQUE^{2,3}, FÁBIO MORATO MONTEIRO⁴, LETÍCIA ZOCOLARO OLIVEIRA^{2*}

¹Recebido para publicação em 22/04/15. Aceito para publicação em 29/12/15.

²Centro Universitário de Rio Preto, Faculdade de Medicina Veterinária, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Laboratório de Fertilização *In Vitro* (FertVitro), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴Instituto de Zootecnia, Centro APTA Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil.

*Autor correspondente: leticiaoliveira@unirp.edu.br

RESUMO: Devido à ampla e consolidada comercialização de embriões bovinos e também por possuir o maior rebanho comercial do mundo, o Brasil atualmente ocupa posição importante no cenário mundial de produção *in vitro* (PIV) de embriões. Entretanto, desvios na proporção do sexo têm sido frequentemente relatados para embriões PIV. O presente trabalho teve por objetivo avaliar as taxas de prenhez e sexagem fetal de embriões bovinos PIV aos 60 dias após transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Foram utilizadas como doadoras de oócitos fêmeas *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=2.920) e como receptoras 30.912 vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). Em 11.341 destas receptoras foi realizada sexagem fetal aos 60 dias de gestação. Não foi observada diferença (P>0,05) para taxa de prenhez, nem para perda embrionária, entre os estágios de desenvolvimento do embrião no momento da TETF (blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido). Com relação ao sexo dos produtos obtidos, foi observada maior porcentagem de embriões macho nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido, e maior porcentagem de embriões fêmea no estágio de blastocisto inicial. Destaca-se que os resultados obtidos com os embriões nos estágios de desenvolvimento blastocisto e blastocisto expandido são bastante fidedignos, visto que número significativo de embriões nestes estágios foi transferido, e que o resultado obtido com embriões no estágio de desenvolvido blastocisto inicial deve ser visto com ressalva dado o número reduzido de embriões neste estágio.

Palavras-chave: embriões bovinos, prenhez, produção *in vitro*, sexagem fetal.

SEX RATIO OF IN VITRO PRODUCED EMBRYOS 60 DAYS AFTER FIXED-TIME EMBRYO TRANSFER ACCORDING TO THE DEVELOPMENTAL STAGE OF THE IMPLANTED EMBRYO

ABSTRACT: In view of its wide and consolidated sale of bovine embryos and because it has the world's largest herd, Brazil currently occupies an important position in the worldwide scenario of *in vitro* production (IVP) of embryos. However, sex ratio deviations have been frequently reported for IVP embryos. The objective of this study was to evaluate the pregnancy rates and fetal sex of IVP bovine embryos 60 days after fixed-time embryo transfer (FTET). Nelore females (*Bos taurus indicus*, n=2,920) were used as oocyte donors and 30,912 crossbred cows (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) were used as recipients. Of these recipients, 11,341 were submitted to fetal sexing at 60 days of gestation. No difference (P>0.05) in pregnancy rate or embryo loss was observed between stages of embryo development at the time of FTET (early blastocyst, blastocyst, and expanded blastocyst). Regarding the sex of the products obtained, there was a higher percentage of male embryos in the blastocyst and expanded blastocyst stages and a higher percentage of female

embryos in the early blastocyst stage. It should be noted that the results obtained for embryos in the blastocyst and expanded blastocyst stages are highly reliable, considering that a significant number of embryos in these stages were transferred. The results obtained for embryos in the early blastocyst stage should be seen with caution in view of the reduced number of embryos in this stage.

Keywords: bovine embryos, pregnancy, in vitro production, fetal sexing.

INTRODUÇÃO

A crescente exigência mundial para produção de alimentos seguros e de forma sustentável tem levado a pecuária bovina a adaptações, visando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Nesse sentido, as biotecnologias da reprodução animal têm contribuído para a produção de animais com genótipos superiores e com eficiência produtiva destacada, em curto período de tempo (RUFINO *et al.*, 2006; MARTINS, 2010).

Assim como a inseminação artificial potencializa o uso de material genético de touros superiores, a transferência de embriões difunde o material genético de fêmeas superiores acasaladas com reprodutores melhoradores. Dessa forma, a transferência de embriões alcançou resultados mais estáveis, tornando-se um grande nicho de mercado e operando em níveis comerciais atualmente no Brasil, com mais de 500.000 embriões bovinos sendo produzidos e transferidos a cada ano. Sua importância básica consiste na possibilidade de uma fêmea produzir número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (RUFINO *et al.*, 2006; PASA, 2008; MARTINS, 2010; RIBEIRO FILHO *et al.*, 2011; SCANAVEZ *et al.*, 2013).

O método *in vitro* se tornou a técnica de escolha para a produção de embriões, especialmente por ser mais utilizada em raças zebuínas, as quais fisiologicamente possuem maior população folicular, maior recuperação de oócitos por aspiração e, conseqüentemente, maior produção embrionária. A produção de embriões *in vitro* (PIV) é considerada ferramenta eficiente para a produção de animais de maior mérito genético, sendo um instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre as gerações e acelerando o melhoramento genético animal, além de permitir o estudo do desenvolvimento embrionário pré-implantação. Vários fatores podem influenciar nos seus resultados: diferentes

metodologias de maturação, cultivo, capacitação espermática, individualidade de doadora e do touro, entre outros (FARIN e FARIN, 1995; FLORENTINO, 2011; SCANAVEZ *et al.*, 2013; LOIOLA, 2013).

O crescimento dessa biotecnologia no Brasil permitiu sua aplicação em larga escala e a exportação desse modelo para vários países latino-americanos e de outros continentes. O cultivo de embriões ainda é um dos passos da PIV que continua sendo estudado e o qual é importante para que sejam obtidas boas taxas de desenvolvimento de embriões viáveis. As taxas de produção embrionária se estabilizaram em torno de 35% de blastocistos no sétimo dia de cultivo, variando entre laboratórios. A qualidade destes encontra-se bastante variável devido aos diferentes protocolos utilizados (BRUM *et al.*, 2002; LOIOLA, 2013) e à qualidade dos oócitos ou dos espermatozoides (SARTORI e GUARDIEIRO, 2010).

Estudos têm reportado elevada proporção de machos entre os embriões mamíferos produzidos *in vitro*. Apesar das causas deste desvio ainda não estarem completamente esclarecidas, há fortes evidências de que procedimentos da PIV podem estar relacionados com a ocorrência deste desvio sexual para machos, como os meios de preparação espermática (RHEINGANTZ, 2006), a presença de glicose (BREDBACKA e BREDBACKA, 1996a; 1996b) ou a composição do meio de cultivo (PEGORARO *et al.*, 1998; LONERGAN *et al.*, 2001). Os componentes do meio de cultivo podem influenciar a velocidade de desenvolvimento e/ou a sobrevivência dos embriões de determinado sexo devido a diferenças metabólicas ligadas ao sexo do embrião macho (PEIPO e BREDBACKA, 1996; CARVALHO *et al.*, 1996; RHEINGANTZ *et al.* 2004).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as taxas de prenhez e sexagem fetal de embriões bovinos PIV aos 60 dias após transferência de embriões em tempo fixo (TETF), em um estudo de campo que compara a proporção sexual avaliada por sexagem fetal de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões no dia da transferência.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente relato foi conduzido baseando-se no levantamento de dados dos trabalhos de campo realizados em diversas fazendas comerciais, durante o período de 30/07/2013 a 30/07/2014, pelo Laboratório de Fertilização *In Vitro* (FertVitro), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Foram utilizadas como doadoras de oócitos fêmeas *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=2.920) selecionadas com base no mérito genético. Esses animais apresentavam escore de condição corporal, idade e atividade ovariana adequados à realização da aspiração folicular. Como receptoras, foram utilizadas cerca de 30.912 vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), após serem avaliadas por exames ginecológicos. Em 11.341 destas receptoras foi realizada sexagem fetal aos 60 dias de gestação.

As doadoras foram submetidas ao processo de aspiração folicular, sendo que antes de cada procedimento foram realizados higienização e antissepsia da região perineal e anestesia epidural baixa (3 a 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2%). O material aspirado foi avaliado e os oócitos considerados viáveis deram início à PIV de embriões no laboratório. Os complexos de ovócitos e células do *cumulus oophorus* foram maturados, durante 24 h, em meio TCM-199/25 mM hepes com 10% soro fetal bovino (SFB), 0,01 UI/mL FSH, 5 µg/mL LH, 0,05 mg/mL sulfato de estreptomicina e 0,065 mg/mL penicilina G potássica, em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e 95% de umidade relativa (até 20 ovócitos em 80 µL de meio). Após o período de maturação, os ovócitos foram transferidos para o meio de fecundação TALP FIV (PARRISH *et al.*, 1988), em grupos de 20 ovócitos em 80 µL de meio, onde foram imediatamente inseminados por espermatozoides preparados. Para a preparação espermática, o sêmen descongelado foi centrifugado a 5000 RPM, durante 5 min em gradiente de Percoll (45%/90%). Após a centrifugação, a fração superior do tubo foi removida. O pellet foi então recuperado para ser utilizado para FIV dos ovócitos maturados. A inseminação foi realizada pela adição de 1,5x10⁶ espermatozoides/mL ao meio de fecundação contendo os ovócitos. Os gametas foram incubados durante 18 a 22 horas a 38,8°C, em estufa com 5% de CO₂ em ar e umidade relativa acima de 90%. Após o período de FIV, removeu-se o excesso de células e os presumíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de 50 µL de meio CR2, suplementado com 10% de SFB. As gotas de meio de cultivo foram cobertas com óleo mineral. Os zigotos foram cultivados durante 7 dias (até D-8), em estufa a

38,8°C, com 95% de umidade relativa e 5% CO₂ em ar. No dia 8, os blastocistos foram avaliados, classificados e envasados para a posterior TETF. Somente embriões nos estágios blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foram selecionados para transferência. Os embriões a serem transferidos foram selecionados ainda de acordo com os critérios preconizados pela *International Embryo Transfer Society* (IETS, 1998). Somente embriões de grau I e II (excelentes e bons, respectivamente) foram transferidos.

Antes da inovulação das receptoras, foi realizada avaliação do tônus uterino e dos ovários para verificar a presença e o tamanho do corpo lúteo. As receptoras com presença de CL foram submetidas a um protocolo de TETF, nas quais foram transferidos apenas os embriões nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido. Os embriões foram transferidos a fresco (não criopreservados). O protocolo da TETF consistiu na administração de benzoato de estradiol (Gonadiol®, 2mg, via intramuscular; Coopers, SP, Brasil) e aplicação do implante intravaginal de progesterona (P4, 0,558g, Cronipres® Mono dose M-24; Biogênese-Bagó, Curitiba, PR, Brasil), no primeiro dia do protocolo, determinado dia 0 (D0). O implante de P4 permaneceu por 8 dias. No D8, foi feita a remoção do implante e administração de prostaglandina (cloprostenol; 2 ml via intramuscular; Ciosin®, Schering-Plough, São Paulo, SP, Brasil), cipionato de estradiol (0,5 ml via intramuscular; E.C.P®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) e gonadotrofina coriônica equina (2 ml via intramuscular profunda; Novormon®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil). A transferência dos embriões foi feita no D17, dia 7 do ciclo estral, no terço médio-final do corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentou CL.

O diagnóstico de prenhez foi realizado por exame ultrassonográfico (DP-2200 vet, Mindray, Shenzhen, China), no mínimo, 30 dias após a data da fecundação *in vitro*, levando em consideração a visualização do conceito e sua viabilidade. As receptoras que foram diagnosticadas prenhes foram separadas e submetidas a segunda avaliação ultrassonográfica para confirmação da prenhez e determinação do sexo fetal. Após a constatação da viabilidade fetal entre os 60 e 90 dias de gestação, foi realizada a sexagem fetal a partir da identificação do tubérculo genital.

Para comparar a proporção sexual e número de receptoras prenhes aos 30 e 60 dias após a TETF, nas classes de desenvolvimento embrionário, utilizou-se o teste exato de Fisher pelo PROC FREQ (SAS, Inst., Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Os resultados obtidos a campo após TETF de embriões PIV, considerando a taxa de prenhez por estágio de desenvolvimento embrionário (Bi, Bl e Bx), são mostrados na Tabela 1.

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de prenhez entre os estágios de desenvolvimento do embrião no momento da TETF. Também não foi observada diferença ($P>0,05$) para perda embrionária entre os estágios de desenvolvimento do embrião transferido. Com relação ao sexo dos produtos obtidos após TETF de embriões PIV, os resultados da sexagem fetal por estágio de desenvolvimento do embrião transferido (Bi, Bl e Bx) são mostrados na Tabela 2. Foi observada diferença ($P<0,05$) do sexo do feto, em todos os estágios de desenvolvimento embrionário.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observada média de prenhez de 40% aos 30 dias e de 37% aos 60 dias de gestação. Segundo NEVES *et al.* (2010), a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% e com índices de prenhez também em torno 40%, demonstrando

que os resultados apresentados no presente estudo estão em conformidade com os índices relatados na literatura.

Com relação à taxa de prenhez por estágio de desenvolvimento embrionário, HASLER *et al.* (2002) também observaram taxas similares para todos os estágios de blastocistos PIV, embora a taxa de gestação tenha sido significativamente menor para as mórulas comparados com todos os estágios de blastocistos. SHEA (1981) não observou diferença nas taxas de prenhez para os embriões transferidos dos dias sete e oito, no estágio de blastocisto (58% e 56%, respectivamente). O mesmo autor obteve taxas de gestações similares quando comparados resultados de embriões com diferentes estágios de desenvolvimento, de mórula a blastocisto expandido (53 a 64%, respectivamente). O mesmo foi observado por SPELL *et al.* (2001), os quais relataram taxas de prenhez similares para mórula compacta (73,4%), blastocisto inicial (73,1%) e blastocisto (63,2%), após a transferência de 448 embriões. Da mesma forma, no presente estudo não foi observada diferença na taxa de prenhez entre os estágios de desenvolvimento do embrião transferido.

Foram observadas perdas embrionárias similares (0%, 3% e 4%) para os embriões transferidos nos estágios de Bi, Bl e Bx. Por outro

Tabela 1. Taxa de prenhez após transferência em tempo fixo de embriões produzidos *in vitro*, por estágio de desenvolvimento embrionário

	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Total
Prenhez aos 30 dias gestação	19,57% (9/46)	36,72% (5643/15369)	43,53% (6746/15497)	40,10% (12398/30912)
Prenhez aos 60 dias gestação	19,57% (9/46)	33,74% (5185/15369)	39,67% (6147/15497)	36,68% (11341/30912)
Total	46	15369	15497	30912

Tabela 2. Sexo do feto aos 60 dias gestação após transferência em tempo fixo de embriões produzidos *in vitro*, por estágio de desenvolvimento embrionário

Sexo do feto aos 60 dias gestação	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Total
Macho	11,11% a (1/9)	49,64% a (2575/5185)	52,12% a (3204/6147)	50,95% (5780/11341)
Fêmea	22,22%b (2/9)	41,71% b (2164/5185)	38,18% b (2347/6147)	39,79% (4513/11341)
Embriões não sexados	66,00% (6/9)	8,60% (446/5185)	9,69% (596/6147)	9,23% (1048/11341)
Total	9	5185	6147	11341

Médias seguidas de letra diferente, na coluna, diferem entre si ($P<0,05$).

lado, foi observada maior proporção de fetos sexados como macho para os embriões transferidos nos estágios de B1 e Bx, e maior proporção de fetos sexados como fêmea para os embriões no estágio de B1, apesar do número muito reduzido de embriões transferidos nesse estágio. Resultados semelhantes já foram relatados por vários autores, sendo maior proporção de fêmeas para mórulas PIV e de machos para blastocistos expandidos PIV (AVERY *et al.*, 1989; KING, 1991; HASLER *et al.*, 2002).

Segundo KING (1991), embriões machos e fêmeas desenvolvem-se em diferentes taxas de crescimento *in vitro*, mas não *in vivo*, o que sugere que o desenvolvimento embrionário pode ser influenciado pelo sistema de cultivo, de acordo com o sexo do embrião. Assim como KING (1991), outros autores (BREDBACKA e BREDBACKA, 1996a; PEIPO e BREDBACKA, 1996; LONERGAN *et al.*, 2001) sugerem ainda que o tipo de substrato energético usado nos meios de cultivo, como por exemplo a glicose, favorece o desenvolvimento de embriões machos, influenciando a proporção do sexo dos embriões a serem transferidos.

Estudos sobre a proporção macho:fêmea de embriões cultivados na presença de SFB tem sido apresentado com certa controvérsia. FEUGANG *et al.* (2009) relatam que o SFB aumenta a cinética do desenvolvimento, o número de células e o número de blastocistos que cresce a este estágio. GILARDI *et al.* (2004) constataram que o uso de SFB e de albumina sérica bovina não interferiam nesta proporção. Entretanto, GUTIÉRREZ-ADÁN *et al.* (2001) relataram maior número de embriões machos com uso do SFB. Adicionalmente, LONERGAN *et al.* (2001) observaram que a presença do SFB em meio SOF não apenas resultou em desenvolvimento mais rápido de blastocistos mas também aumentou a sobrevivência de embriões machos no geral.

Os exemplos mais frequentes com relação a estas observações estão bem evidenciados nas taxas e velocidade de clivagem nos primeiros dias de cultivo, que parecem ser favorecidas nos embriões do sexo masculino. Esta característica fica amplificada a campo quando se seleciona embriões que se apresentam no estágio de blastocisto para transferência em receptoras após o sétimo dia de cultivo (ELIAS, 2011). Assim, diversos trabalhos têm demonstrado que os sistemas de produção *in vitro* de embriões, frequentemente promovem um desvio na proporção macho:fêmea, prevalecendo uma porcentagem de embriões do sexo masculino superior à proporção teoricamente esperada de 50% para cada um dos sexos (GUTIÉRREZ-ADÁN *et al.*, 2001; LARSON *et al.*, 2001).

Neste sentido, ELIAS (2011) destaca a hipótese de que a seleção de blastocistos com desenvolvimento mais avançado para transferência em receptoras favorece a seleção de machos. Assim, o momento da seleção dos embriões pode alterar a proporção sexual dos nascimentos após a transferência, na medida que quanto mais cedo a seleção dos embriões, maior a probabilidade de transferir maior número de embriões machos do que fêmeas. Isso porque a maior parte dos primeiros blastocistos a serem formados seria constituída do sexo masculino, corroborando com os resultados do presente estudo (Tabela 2). Desse modo, uma seleção mais tardia poderia permitir que os embriões fêmea, em maior parte concentrados em fases iniciais do estágio de blastocisto, se desenvolvessem até estágios mais avançados e pudessem ser transferidos, apresentando maior probabilidade de gerarem uma prenhez.

Adicionalmente, HASLER *et al.* (2002) também mostraram semelhança com o presente relato, cuja maior ocorrência de fetos fêmeas foi maior a partir de mórulas e blastocistos iniciais, e os fetos machos resultaram de estágios mais avançados de desenvolvimento. Adicionalmente, MELLO (2004), demonstrou que 79,7% dos embriões sexados como fêmea corresponderam aos estágios de B1 e Bx, contra 65,4% de machos. A suplementação do meio de cultivo com glicose e SFB influenciou o sexo de blastocistos PIV. As diferenças na velocidade de crescimento entre zigotos XX e XY sugerem que algum gene ligado ao cromossomo Y poderia se expressar em fases muito precoces do desenvolvimento.

O protocolo laboratorial utilizado para a produção dos embriões bovinos do presente trabalho inclui a presença de SFB, mas não de glicose nem de albumina sérica bovina, no meio de cultivo *in vitro*. Portanto, é provável que a presença do SFB, associado à preferência em selecionar embriões nos estágios de B1 e Bx, pode ter influenciado a maior proporção de machos nos embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento (B1 e Bx). Ressaltamos que conclusões baseadas nas análises com número reduzido de embriões (como ocorreu com B1 no presente trabalho) devem ser vistas com ressalva.

Alguns autores (PEGORARO *et al.*, 2002; RHEINGANTZ *et al.*, 2004; 2006) apontam ainda que a utilização do método *swin-up* para a preparação espermática, quando comparado com a centrifugação em gradiente de Percoll, pode influenciar maior proporção de machos nos embriões PIV. Visto que a centrifugação em gradiente de Percoll 45%/90%

foi o método de seleção espermática utilizado no presente trabalho, esse fator pode ser descartado para explicar o desvio na proporção de sexo.

Diversos estudos *in vitro* de espécies tais como bovinos, ovinos, macacos, porcos e humanos (KOCCHAR *et al.*, 2001) mostraram que os machos progridem em alguns estágios do desenvolvimento mais rápidos que as fêmeas e consistem de número maior de células que as fêmeas no estágio de blastocisto. Em bovinos, a proporção de machos é significativamente maior entre embriões que clivam ao estágio de 2 células dentro das 30 primeiras horas após a fertilização (ELIAS, 2011). Assim sendo, a preferência por transferência de embriões nos estágios de B1 e Bx (a fim de assegurar maiores taxas de prenhez) parece, de fato, resultar em maior proporção de nascimentos de machos.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, no qual se analisou expressivo número de prenhez oriundas de blastocistos bovinos PIV transferidos por TETF em escala comercial, indicaram que mais embriões fêmea se concentraram nas fases iniciais do desenvolvimento (blastocisto inicial), enquanto que os embriões machos encontraram-se, em sua maioria, nas fases mais avançadas de desenvolvimento embrionário (blastocisto e blastocisto expandido), embora não tenha sido observada diferença na taxa de prenhez com relação ao estágio de desenvolvimento em que o embrião se encontrava no momento da transferência. Destaca-se que os resultados obtidos com os embriões nos estágios de desenvolvimento blastocisto e blastocisto expandido são bastante fidedignos, visto que número significativo de embriões nestes estágios foi transferido, e que o resultado obtido com embriões no estágio de desenvolvido blastocisto inicial deve ser visto com ressalva dado o número reduzido de embriões neste estágio.

REFERÊNCIAS

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.

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

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

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; RAUBER, L.P.; MEZZALIRA, A.; BRASS, K.E.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.87-92, 2002.

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.

ELIAS, F.P. **Avaliação da proporção sexual de embriões desenvolvidos in vitro e de progênie a campo com touros jovens**. 2011. 95p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.

FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, v.52, p.676-682, 1995.

FEUGANG, J.M.; RODRÍGUEZ, O.C.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v.121, p.141-149, 2009.

FLORENTINO, C.M. **Fatores que influenciam no sucesso da produção in vitro de embriões em receptoras bovinas criadas na região da Amazônia legal**. 2011. 84p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2011.

GILARDI, S.G.T.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; MACHADO, M.A.; SERAPIÃO, R.V.; SOARES, A.B.M.; PINHO, T.G.; VIANA, J.H.M. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.623-627, 2004.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Effect of the *in vitro* culture system on the karyotypes of blastocysts development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117-1126, 2001.

HASLER, J.F.; CARDEY, E.; STOKES, J.E.; BREDBACKA, P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v.58, p.1457-1469, 2002.

IETS - International Embryo Transfer Society. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ed. Sovay, Illinois: International Embryo Transfer Society, Inc. 1998., 180p.

- KING, W.A. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v.32, p.99-103, 1991.
- KOCCHAR, H.P.S.; PEIPPO, J.; KING, W.A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v.55, p.3-14, 2001.
- LARSON, M.A.; KIMURA, K.; KUBISH, H.M.; ROBERTS, R.M. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.9677-9682, 2001.
- LOIOLA, M.V.G. **Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de óocitos e de embriões por longas distâncias**. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2013.
- LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture on the kinetics of development and sex ratio of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.55, p.430, 2001.
- MARTINS, C. F. O impacto da transferência de embriões (TE) e da fecundação *in vitro* (FIV) na produção de bovinos no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/243/>>. Acesso em: 24 jan. 2015.
- MELLO, V.F. **Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através de ultra-sonografia**. 2004. 105f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.
- NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.414-421, 2010.
- 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.
- PASA, C. Transferência de embriões em bovinos. **Biodiversidade**, v.7, p.66-74, 2008.
- PEGORARO, L.M.C.; THUARD, J.M.; DELALLEAU, N.; GUERIN, B.; DESCHAMPS, J.C.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or Vero cells. **Theriogenology**, v.49, p.1579-1590, 1998.
- PEGORARO, L.M.C.; RHEINGANTZ, M.G.T.; DESCHAMPS, J.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; SAALFELD, M.H. Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p. 751, 2002.
- PEIPO, J.; BREDBACKA, P. Male bovine zygotes cleave earlier than female zygotes in the presence of glucose. **Theriogenology**, v.45, p.187, 1996.
- RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.32-39, 2004.
- RHEINGANTZ M.G.T The sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation. **Animal Reproduction**, v.3, p.423-430, 2006.
- RIBEIRO FILHO, A.L.; RODRIGUES, A.S.; LIMA, M.C.C.; FERRAZ, P.A.; LOIOLA, M.V.G.; BITTENCOURT, R.F. Taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos com diferentes graus de dificuldades no procedimento de inovulação. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.727-732, 2011.
- RUFINO, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Determinação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de métodos com ênfase para a PCR. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.1-7, 2006.
- SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.422-432, 2010.
- SCANAVEZ, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.722-728, 2013.
- SHEA, B.F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenology**, v.15, p.31-42, 1981.
- SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, p.287-297, 2001.