

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS.¹

GUILLERMO PABLO ALMEIDA², RAFAEL HERRERA ALVAREZ³

Recebido para publicação em 11/06/03. Aceito para publicação em 29/11/03.

²Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce, Universidad Nacional de Mar del Plata. Cc 276 (7620), Balcarce, Bs. As., Rep. Argentina. e-mail: gpalmeida@yahoo.com.ar

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Reprodução Animal, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP.

RESUMO: A identificação do sexo do embrião, antes da transferência, possibilita o uso mais racional das receptoras, além de oferecer alternativas de ganho, econômico e gerencial, decorrente da escolha programada do sexo dos descendentes. A presente revisão descreve o estado atual dos conhecimentos das principais técnicas utilizadas para identificar o sexo do embrião bovino no seu estágio inicial de desenvolvimento.

Pavavras-chave: identificação do sexo, embrião, PCR, FISH

SEX DETERMINATION METHODS IN BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT: Identifying the sex of the embryo before transferring it, enables a more rational use of receptor females. Besides, being able to choose the sex of the offspring in a programmed way, sex determination offers alternatives of economic and management profit. This review, describes the present state of knowledge about current techniques employed to identify the sex of bovine embryos at early stages of development.

Key words: sex identification, embryo, PCR, FISH

INTRODUÇÃO

A possibilidade de selecionar o sexo da descendência oferece vantagens de ordem prática e econômica à indústria de produção animal (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Pela sua simplicidade, a inseminação artificial (IA) com sêmen "sexado" seria o método ideal para escolher o sexo dos bovinos (VAN VLIET *et al.*, 1989). Infelizmente, as técnicas de separação dos espermatozoides X e Y ainda não oferecem as condições básicas (de

inocuidade, eficiência, reprodutibilidade, simplicidade, rapidez e economia) para que o método tenha uma aplicação comercial, em grande escala (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Mesmo a mais promissora delas, a fluorocitometria de fluxo, embora apresente uma precisão de ~90% nos nascimentos do sexo desejado (JOHNSON, 2000), tem uso restrito no mercado devido ao alto custo e baixo rendimento (BLECHER *et al.*, 1999). Dessa forma, a alternativa para selecionar crias de um determinado sexo consiste na identificação precoce do sexo de embriões, antes da transferência em fêmeas "receptoras". É importante lembrar que a de-

terminação do sexo dos conceptos já implantados pode ser realizada mediante ultra-sonografia. Entretanto, quando o sexo do feto não corresponde ao desejado, a alternativa de aborto nem sempre resulta em benefício econômico.

Nos bovinos, a exploração comercial da transferência de embriões (TE) de fêmeas “doadoras” foi possível graças ao aperfeiçoamento das técnicas não cirúrgicas de recuperação uterina de embriões bovinos no início de desenvolvimento (BRAND e DROST, 1977a; BRAND e DROST, 1977b). Nessa época (anos 70) foram também iniciados os estudos mais consistentes visando determinar o sexo dos embriões antes da sua transferência em receptoras (HARE *et al.*, 1976, HARE e BETTERRIDGE, 1978). Posteriormente, o desenvolvimento da técnica de fertilização *in vitro* (FIV), disponível em escala comercial no final da década dos 80 (FIRST e PARRISH, 1987), deu um grande impulso às pesquisas nessa área, devido à disponibilidade, em maior quantidade, de material biológico (embriões) utilizado nos experimentos.

A maioria das técnicas que permitem a identificação do sexo embrionário na etapa de pre-implantação ainda não cumprem com as condições ideais para ser comercialmente viáveis, permanecendo restritas ao laboratório. Segundo VAN VLIET *et al.* (1989), o método ideal para sexagem de embriões deve considerar dois pontos chave: 1) a porcentagem de embriões que pode ser corretamente sexado, e 2) a viabilidade posterior deles ao serem transferidos. O primeiro ponto envolve duas características: eficiência e precisão (ou exatidão). Eficiente significa que a técnica permite sexar o maior número possível dos embriões. Precisão significa, neste caso, que os embriões sexados como XX sejam realmente fêmeas, e os sexados como XY, sejam machos. A segunda condição (viabilidade) depende do grau de dano que a técnica de sexagem cause aos embriões, e que ela possa ser realizada em embriões suficientemente jovens para poder ser transferidos ou criopreservados. No caso dos bovinos, isso equivale aos estágios de mórula ou blastocisto, de até 8 dias de idade (SEIDEL e ELSDEN, 1997).

Além disso, para ser comercialmente viável a técnica de sexagem deve ser reproduzível, barata e rápida o suficiente para permitir avaliar um grande número de embriões em pouco tempo (VAN VLIET *et al.*, 1989). Por enquanto, apenas uma delas, a que usa a reação em cadeia da polimerase (PCR = *polymerase chain reaction*) parece cumprir as condições acima assinaladas, estando credenciada para ser utilizada na

sexagem de embriões de alto valor genético. Isso não significa que outras técnicas não possam, em um futuro próximo, atingir as condições requeridas e eventualmente apresentar maiores vantagens que a realizada por PCR.

A presente revisão objetiva apresentar os procedimentos atualmente disponíveis destinados à determinação do sexo dos embriões bovinos no estágio de preimplantação.

MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES

As diferentes técnicas que têm sido utilizadas para conhecer ou inferir o sexo dos embriões podem ser classificadas em dois grupos, dependendo se for ou não preservada a integridade física dos embriões: as técnicas que requerem uma biópsia, chamados de “técnicas invasivas” e as “técnicas não invasivas” em que o processamento é realizado no embrião intacto (BETTERRIDGE, 1989).

A. TÉCNICAS “NÃO INVASIVAS”

No quadro 1 são apresentadas uma síntese das diferentes técnicas “não invasivas” disponíveis para identificar os sexos dos embriões.

Observações iniciais realizadas em embriões de camundongo obtidos *in vivo* (TSUNODA *et al.*, 1985; BURGOYNE, 1993) e *in vitro* (VALDIVIA *et al.*, 1993) evidenciaram diferentes velocidades de desenvolvimento dos embriões XY (machos) em comparação dos embriões XX (fêmeas), sendo que aproximadamente 75% dos machos alcançam o estágio de blastocisto em menor tempo que as fêmeas. O mesmo fenômeno foi observado em embriões suínos (CASSAR *et al.* 1994), humanos (RAY *et al.*, 1995), ovinos (BERNARDI e DELOUIS, 1996) e bovinos (AVERY *et al.*, 1989; AVERY *et al.*, 1991; XU *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 1996; LONERGAN *et al.*, 1999). Tais diferenças indicariam que a velocidade de desenvolvimento em cultura poderia ser usada como um parâmetro simples para desviar a relação dos sexos. Porém, nem todos os estudos conseguiram evidenciar essas diferenças (YADAV *et al.*, 1990; GRISART *et al.*, 1995). Ainda, BERG *et al.* (1992) não obtiveram diferenças na relação dos sexos quando transferiram mórulas e blastocistos bovinos da mesma idade (7 dias) em vacas receptoras.

Quadro 1. Técnicas “não invasivas” usadas para determinar o sexo dos embriões*

TÉCNICA	DIFERENÇA EXPLORADA NOS EMBRIÕES
Cultivo <i>in vitro</i> até o estágio de blastocisto	Velocidade de desenvolvimento
Dosagens enzimáticas (G6PD, HPRT...)	Secreções enzimáticas originadas pelo cromossomo X
Cito-toxicidade usando anticorpos e complemento	Presença do antígeno HY por detecção serológica
Imuno-fluorescência indireta	Presença do antígeno HY por detecção serológica
Inibição do desenvolvimento usando anticorpos	Presença do antígeno HY por detecção serológica

* Modificado de VAN VLIET *et al.* (1989) e PEGORARO e LIMA (2001).

Trabalhos de LAZZARI *et al.* (1995) e GUTIERRES-ADAN *et al.* (1996) mostraram que a diferença na relação dos sexos desaparece quando os embriões bovinos são incubados nas trompas uterinas de ovelhas até a expansão do blastocisto. Em razão desses resultados contraditórios, são necessários mais estudos sobre o que acontece *in vivo* depois que os embriões são transplantados, para determinar se este método é ou não apropriado para desviar a relação 1:1 no sexo da descendência.

Os embriões XX sofrem a inativação de um dos seus cromossomos sexuais em etapas precoces da sua vida (LYON, 1972). Algumas enzimas, tais como a glucose-6-fosfato-deshidrogenase (G6PD) e a hipoxantina-fosforribosil-transferase (HPRT) são codificadas especificamente por genes do cromossomo X. Entre o momento da ativação do genoma embrionário e a inativação do segundo X do par, a secreção dessas enzimas poderia ser maior (até do dobro) nos embriões XX do que nos embriões XY (MONK e HARPER, 1978). WILLIAMS (1986) dosou a enzima G6PD em embriões de camundongo antes de ser transplantados para receptoras. Dos embriões com maior produção de G6PD, 72% foram fêmeas. A mortalidade embrionária, porém, foi elevada (65%), possivelmente devido à toxicidade do corante utilizado na dosagem. MONK e HANDYSIDE (1988) dosaram a HPRT a partir de um só blastômero extraído de embriões murinos de oito células. Transplantados em receptoras, foi obtida 91% de precisão na determinação do sexo das fêmeas e 100% na dos machos. A mortalidade (~28%) foi menor quando comparada à dosagem de G6PD, mas a técnica usada não pode ser considerada “não invasiva”, pois os embriões sofreram uma biópsia. A

ativação do genoma próprio parece acontecer no estágio de 8 células em embriões murinos (MONK e KATURIA, 1977), e entre 8 e 16 células nos embriões bovinos (BETTERRIDGE, 1988). O momento preciso da inativação do segundo X não está perfeitamente definido (RIEGER, 1984), embora o padrão parece situar-se em torno à formação do blastocisto, tanto em camundongos (TAKAGI, 1978) quanto em bovinos (BONDIOLI, 1992). Isto faz com que as dosagens de HPRT em alguns embriões poderia estar sendo feita no momento inadequado, resultando na identificação incorreta do sexo (VAN VLIET *et al.*, 1989). Dessa forma, além das limitações operacionais (a biópsia de uma única célula é mais difícil de realizar em mórulas compactas ou em blastocistos que em embriões de 8 células), essas técnicas enzimáticas têm uma limitação de tempo de manipulação.

A detecção imunológica da presença do antígeno HY na superfície dos blastômeros foi também usada como determinante do sexo embrionário. O HY é um antígeno de histocompatibilidade menor, codificado no cromossomo sexual Y (SIMPSON *et al.*, 1987). Como estaria presente somente nas células XY, sua detecção nos blastômeros poderia servir para determinar o sexo embrionário (ANDERSON, 1987). O HY é detectável em embriões de oito ou mais células, sendo sua detecção mais difícil em blastocistos (KRCO e GOLDBERG, 1976; WHITE *et al.*, 1984). O antígeno HY foi usado para determinar o sexo embrionário seguindo três alternativas diferentes: cito-toxicidade, imuno-fluorescência indireta, e inibição do desenvolvimento dos embriões HY+ (machos). Em todas elas, o processo começa pela produção de anticorpos (anti-HY), para depois confrontá-los com os antígenos (HY) da superfície dos blastômeros.

No método da cito-toxicidade, a adição de complemento lisaria os complexos antígeno-anticorpo (anti-HY) dos embriões masculinos (HY+), e os embriões femininos (HY-) continuariam viáveis. KRICO e GOLDBERG (1976) foram os primeiros a usar esse método, sem contudo, conferir o sexo de cada grupo. Estudos posteriores confirmaram que aproximadamente 92% dos embriões não lisados e transferidos para receptoras eram femininos (EPSTEIN *et al.*, 1980). Índices semelhantes foram obtidos em ratos (UTSUMI *et al.*, 1983), bovinos (UTSUMI *et al.*, 1984; LIMA *et al.*, 1993) e caprinos (UTSUMI *et al.*, 1984). O problema do método de citotoxicidade é que os embriões HY+ tornam-se não viáveis (ANDERSON, 1987) ou com o seu desenvolvimento comprometido. Na tentativa de contornar esse problema, WHITE *et al.* (1983) adaptaram em embriões murinos uma técnica de imuno-fluorescência indirecta usada por GALBRAITH *et al.* (1978) para detectar o HY nas células corporais. A técnica de imuno-fluorescência indirecta utiliza um segundo anticorpo marcado com fluorocromo, para evidenciar o complexo antígeno-primeiro anticorpo. WHITE *et al.* (1983) compararam os resultados da imuno-fluorescência indirecta e os da prova de citotoxicidade em embriões murinos. Nesse trabalho, 78% dos embriões fluorescentes foram machos, enquanto que 83% dos não fluorescentes foram fêmeas. A viabilidade dos embriões sexados por imuno-fluorescência foi semelhante para os embriões HY+ e HY-. Resultados semelhantes com essa técnica de imuno-fluorescência indirecta foram obtidos em embriões bovinos (WACHTEL, 1984; WHITE *et al.*, 1984, 1987b), ovinos (WHITE *et al.*, 1987c), suínos (WHITE *et al.*, 1987a) e equinos (WOOD *et al.*, 1988), com precisão em torno de 85%. O uso de anticorpos monoclonais não melhorou esses índices (LIMA *et al.*, 1993), mais a exatidão no diagnóstico das fêmeas chegou a 90% em embriões bovinos com o emprego de altos títulos de anticorpos produzidos em ratos (MOREIRA-FILHO *et al.*, 2000).

A técnica de inibição do desenvolvimento embrionário consiste em confrontar mórulas com o anticorpo HY; os embriões HY+ detêm seu desenvolvimento nesse estágio, enquanto que os HY- evoluem para blastocistos (UTSUMI *et al.*, 1991). A exatidão do método é superior a 80% nos embriões que evoluem para blastocistos (HY-) e de 80% para os que ficam detidos como mórulas (HY+). A prova já foi realizada com sucesso em embriões de rato (UTSUMI *et al.*, 1991), bovinos (UTSUMI *et al.*, 1993), e de camundongo (RAMALHO *et al.*, 2000). Além de ter alta precisão, essa técnica simples e de baixo custo permite, como a de imuno-fluorescência indirecta, o desenvolvimento posterior

tanto dos embriões HY+, quanto dos HY-.

De modo geral, as técnicas que utilizam o antígeno HY na sexagem imunológica dos embriões, são relativamente simples, baratas e eficientes. O maior inconveniente delas é a falta de especificidade total do antígeno HY, dando lugar a reações cruzadas com outros antígenos, fazendo que sua exatidão média não ultrapasse 90%. Ainda, na imuno-fluorescência indirecta, algumas vezes o segundo anticorpo também mostra inespecificidade, ligando-se a detritos celulares (WHITE *et al.*, 1987c). Por último, tem sido mostrado que, excepcionalmente, alguns embriões femininos podem apresentar reação HY+ (WOLF *et al.*, 1980).

B. TÉCNICAS “INVASIVAS”

As técnicas “invasivas” para determinar o sexo dos embriões têm a vantagem de serem mais reproduzíveis e exatas do que as não invasivas. Seu principal inconveniente é que é preciso recorrer a uma biópsia de cada embrião a ser sexado. A biópsia apresenta dois aspectos a ser considerados: 1) a dificuldade inerente à micromanipulação, e 2) os danos físicos que podem ser acarretados aos embriões. As primeiras manipulações para a obtenção das biópsias requeriam o uso de um ou dois micromanipuladores para realizar a aspiração dos blastômeros. Hoje as técnicas têm sido simplificadas e amostras de 10 ou mais células embrionárias podem ser retiradas por microsecção, usando simples pedaços de lâminas de barbear, coladas a suportes manuais (BRADBACKA *et al.*, 1995; HUHTINEN *et al.*, 1997). As técnicas “invasivas” para determinar o sexo embrionário incluem a análise citogenética e as técnicas de biologia molecular.

a) Análise Citogenética

A análise citogenética, também chamada de análise de cariótipo, foi a primeira técnica pela qual se obtiveram nascimentos de coelhos, bezerras e cordeiros ‘sexados’ (BETTERIDGE, 1989). Resumidamente, a técnica consiste em visualizar os cromossomos do núcleo e determinar o sexo genético identificando o “par sexual” (XX ou XY). Isso é feito em biópsias de 10 a 20 blastômeros, que recebem um mitostático no meio de cultura (KING, 1984) afim de deter, na metáfase, o processo de divisão celular (nesse estágio, os cromossomos são visíveis ao microscópio ótico). Embora apresente boa exatidão, atualmente, essa técnica é pouco usada devido à sua baixa eficiência, que va-

ria de 30% (COTINOT *et al.*, 1991) a 70% (VAN VLIET *et al.*, 1989) decorrente da necessidade de um alto número de células em divisão (10-15), e ao tempo relativamente longo necessário para fazer a sexagem (8 a 14 horas para 12 a 15 embriões). Esse intervalo de espera diminui a viabilidade dos embriões a serem transferidos. Essas limitações reduzem as possibilidades comerciais da técnica. Porém, pela sua precisão (normalmente de 100%), esta técnica é valiosa e continuará sendo usada como método controle para testar a exatidão de outros métodos de sexagem (VAN VLIET *et al.*, 1989).

b) Métodos de Biologia Molecular

São dois os métodos de biologia molecular utilizados: a) Reação em Cadeia da Polimerase ou “*Polimerase Chain Reaction*” (PCR), e b) Hibridização *in situ* ou “*In Situ Hybridization*” (ISH). Atualmente essas técnicas são as mais usadas para a sexagem de embriões devido às suas altas taxas de eficiência (95%) e exatidão (95 – 100%). Além de ser mais rápidas do que a análise citogenética, sua sensibilidade é suficientemente alta para que a sexagem seja realizada a partir de uma única célula (RAO e TOTEY, 1999; PARK *et al.*, 2001; CHRENEK *et al.*, 2001; GAVIO *et al.*, 2001). Tanto a técnica de PCR quanto a de ISH utilizam oligonucleótidos de seqüências conhecidas (especialmente sintetizados), que se unem especificamente a partes do DNA do cromossomo Y. A análise dessa união permite diagnosticar imediatamente o sexo do embrião.

B.1) REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE OU “POLIMERASE CHAIN REACTION” (PCR)

A descoberta da técnica da PCR (SAIKI *et al.*, 1988) motivou os primeiros estudos direcionados à identificação do sexo de embriões bovinos (SCHRODER *et al.*, 1990; HERR e REED, 1991) visando sua exploração comercial (THIBIER e NIBART, 1992).

A sexagem de embriões por PCR baseia-se na multiplicação artificial de pequenas regiões conhecidas de DNA, potencialmente presentes nas células da amostra. Tais seqüências de bases (adenina, timina, citosina e guanina = A, T, C e G) devem ser exclusivas do cromossomo Y (BONDIOLI, 1992). O propósito de multiplicá-las objetiva torná-las facilmente detectáveis por meio de um corante fluorescente para DNA. A multiplicação é obtida usando a enzima polimerase e um par de oligonucleótidos, que são chamados de “*primers*” (iniciadores). Como a multiplicação acon-

tece somente nos embriões machos (XY), os embriões femininos (XX) não apresentam coloração.

O processo inicia com a lise das membranas celular e nuclear para liberar o material genético (DNA original) dos blastômeros, que, segundo LACAZE *et al.* (1996), devem ser no mínimo seis. Em seguida a amostra é submetida à PCR, que consiste na repetição de um processo padrão de três passos: i) desnaturação do DNA original; ii) apareamento, e iii) replicação do DNA. A desnaturação consiste na separação (por calor) da hélice dupla do DNA da amostra a nível das pontes de hidrogênio. Essa etapa precisa de ~30 segundos a temperaturas maiores que 90°C. O apareamento é a união dos ‘*primers*’ às cadeias (agora avulsas) de DNA. Os *primers* são oligonucleótidos de uma vintena de bases, sintetizados artificialmente para terem uma determinada seqüência (complementária de um dos dois extremos do pedaço de DNA escolhido para ser replicado). Os *primers* são utilizados em pares, um para cada extremo do pedaço a replicar. Durante aproximadamente 5 minutos à temperatura entre 30 e 65°C, dependendo do tipo de *primer* e grau de especificidade requerida, eles se acoplam aos seus respectivos alvos nas cadeias avulsas de DNA do Y (no caso de ser um embrião macho). A replicação (ou resíntese) é realizada à temperatura de ação das polimerases termorresistentes (65 a 75°C). A partir dos *primers* já unidos, em presença de um meio de cultura contendo as bases (A, T, G e C) sob a forma de desoxi-nucleósidos tri-fosfatados (dNTP), e da enzima DNA-polimerase (que naturalmente permite a replicação do DNA em organismos termorresistentes), se produz a síntese de cadeias complementarias de DNA (cDNA) às cadeias avulsas de DNA original. As novas duplas cadeias de DNA formadas são de comprimento curto, igual ao pedaço de DNA localizado entre ambos *primers*.

Os tempos, as temperaturas e o número de ciclos podem ser programados em aparelhos especiais para PCR chamados termo-cicladores. Em cada ciclo, esse material é duplicado conseguindo-se que o número dessas moléculas curtas de DNA cresça em progressão geométrica. Assim, no trigésimo ciclo existirão mais de 260.000.000 moléculas iguais (WATSON *et al.*, 1992).

O DNA multiplicado é visualizado utilizando-se o corante brometo de etídio, marcador empregado no final das duas técnicas de PCR para sexagem de embriões atualmente disponíveis: eletroforese em ágar e direta em tubos.

Na eletroforese em ágar (método convencional), o aparecimento de uma banda cor de rosa correspondente ao peso molecular do pedaço de DNA escolhido para ser multiplicado, significando que o embrião do qual foi tomada a biópsia possuía o cromossomo Y (macho). A falta de cor pode indicar um embrião feminino ou então ausência da amostra, enquanto que a reação positiva também poderia ser devida à eventual presença de DNA “contaminante” (DNA próprio do operador, ou remanescente de uma amostra anterior). Dessa forma, é indicado correr amostras controles ao lado das amostras a serem sexadas (Mc PHERSON *et al.*, 1991). Como controles podem ser utilizados DNA obtido de linfócitos ou de outras células corporais de machos e fêmeas (controle de sexos); DNA obtido de células humanas (controle de contaminação); controle de especificidade, que leva todos os reagentes, menos o DNA, e o controle marcador de pesos moleculares, que à luz UV forma bandas cor de rosa em locais predeterminados. Outra forma de fazer controles para ambos os sexos é correr simultaneamente duas PCR para cada amostra: uma para o cromossomo Y e outra (usando o outro par de *primers*) para o cromossomo X, ou então para algum autossomo. Nesse caso, o aparecimento de uma única banda indica que o embrião é XX, e o de duas bandas, XY.

Na técnica de sexagem de embriões direta em tubos, os reagentes, repartidos em duas soluções, são colocados em dois momentos diferentes. Ao final dos ciclos da PCR a cor rosa é observada apenas nos tubos com DNA do Y. As vantagens dessa técnica em comparação com a convencional incluem uma maior velocidade na obtenção dos resultados de sexagem, maior praticidade e menor custo por não ter que correr eletroforese, e menores possibilidades de presença de DNA contaminante, decorrente da menor manipulação das amostras, que permanecem fechadas durante o processo (BREDBACKA *et al.*, 1995). O principal inconveniente desta técnica é que as eventuais reações inespecíficas não são diferenciáveis por não poder ser incluídos outros *primers* (controles) dentro dos tubos das amostras.

B.2) HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (ISH)

A técnica da hibridização *in situ* (ISH) de ácidos nucleicos começou a ser utilizada há mais de 30 anos (GALL e PARDUE, 1969; JOHN *et al.*, 1969). Foi chamada de hibridização *in situ* por ter sido empregada sobre

preparações citológicas e para distingui-la da hibridização bioquímica já existente (HALL e Piegelman, 1961). A ISH possui diversas aplicações. Na determinação do sexo, uma das suas variantes (imuno-fluorescência direta) foi usada pela primeira vez em gestações humanas a partir de células das vilosidades corionicas (GOSDEN *et al.*, 1982).

Na ISH, os oligonucleótidos utilizados (cujo tamanho varia de algumas centenas até vários milhares de bases) recebem o nome de ‘sondas’. As sondas levam substâncias marcadoras e se ligam de forma complementar ao pedaço de DNA cuja presença ou ausência se deseja constatar (GLICK e PASTERNAK, 1994). Na sexagem de embriões pela ISH, o DNA da amostra é colocado na presença de uma sonda marcada. O processo começa fazendo a desnaturação do DNA da amostra (separação da dupla hélice, a temperaturas maiores que 90° C). Simultaneamente, a sonda também é desnaturalizada. O encontro do DNA da amostra e o oligonucleótido sintético acontece sobre uma membrana sólida, tal como nylon ou nitrocelulose, sobre a qual o DNA da amostra fica fixado. Ao não encontrar seqüências do cromossomo Y para se acoplar a sonda fica livre. Um lavado posterior faz com que a sonda livre seja eliminada. Para visualizar a reação positiva, no caso de existir acoplamento, a marcação da sonda deve produzir (de forma direta ou indireta) mudanças visíveis ou então detectáveis por diversos meios. As alternativas na marcação permitem fazer uma classificação dos tipos de ISH (Quadro 2).

Nas técnicas radioisotópicas, as sondas contêm substâncias emissoras de radiação beta, capazes de imprimir um filme fotográfico. As técnicas isotópicas garantem alta sensibilidade (SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 2000), mais são lentas e precisam de cuidados, tanto durante o trabalho quanto na deposição dos seus resíduos, pela radiação que eles emitem (PERRET, 1993).

O emprego de técnicas não isotópicas elimina os inconvenientes inerentes ao uso de substâncias radioativas além de permitir a leitura dos resultados com maior rapidez (VAN DEKKEN *et al.*, 1993). Inicialmente, a sensibilidade delas era baixa, mas foram se aprimorando, de forma que atualmente sua sensibilidade é comparável às isotópicas (VAN DEKKEN *et al.*, 1993; SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 2000). As técnicas não isotópicas indiretas utilizam de sistemas intermediários entre a sonda e a reação perceptível. A sonda está marcada com substâncias (anticorpos e subs-

Quadro 2. Tipos de Hibridização *in situ* (ISH), conforme a substância marcadora utilizada e o tipo de reação final detectável *

a) **TÉCNICA ISOTÓPICA**¹: usa sondas com trítio, ³²P, etc. Torna-se visível com autorradiografia.

A- TÉCNICAS NÃO ISOTÓPICAS DE ISH.

a) **FLUORESCENTES (FISH= 'Fluorescent ISH')**: usam fluorocromos, que emitem cores visíveis à luz UV.

Podem ser diretas¹ ou indiretas².

a) **ENZIMÁTICAS**²: usam peroxidases, fosfatase alcalina, etc.; são sempre indiretas.

i) **Reação cromática**: coloração do substrato presente no meio.

b) **Reação quimio-luminescente**: luminosidade do substrato presente no meio.

i) **Uso de COMPOSTOS METÁLICOS**² (ferritina, ouro coloidal, etc.): apresenta cores visualizáveis.

*adaptado de MOREL (1993) e SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON (2000).

¹ Métodos de marcação direta; foram os mais usados nos anos 80.

² Métodos de marcação indireta; os mais usados na atualidade.

tâncias de alta afinidade) chamadas de “reporter molecules” (MONTGOMERY *et al.*, 1997), ligadas por uma reação de tipo imunológica. Essas substâncias são, por sua vez, marcadas com diversos fluorocromos, enzimas ou eventualmente com compostos metálicos, para produzir reações visíveis (Quadro 2). As “reporter molecules” mais utilizadas são a biotina (uma vitamina do grupo B) e a digoxigenina (um esteróide vegetal). As sondas “biotinizadas” utilizam como molécula de união à avidina, proteína da clara de ovo que tem grande afinidade pela biotina. A avidina é frequentemente substituída pela streptavidina (de origem bacteriana), ou então por anticorpos (PERRET, 1993). LEONARD *et al.* (1987) combinaram sondas biotinizadas com anticorpos marcados para sexar embriões bovinos pela primeira vez. GAVIO *et al.* (2001), usando o sistema biotina-avidina e anticorpo fluorescente (FISH) sexaram com sucesso embriões bovinos (Nelore) usando biópsias de um único blastômero. Já nas sondas marcadas com digoxigenina, a segunda molécula marcada é um anticorpo antidigoxigenina. É possível empregar simultaneamente os dois tipos de sondas (biotina e digoxigenina) para marcar ao mesmo tempo os cromossomos sexuais Y e o X, ou então um determinado autossomo.

As técnicas de ISH atualmente mais empregadas na sexagem de embriões são as não isotópicas indiretas usando marcadores enzimáticos ou fluorescen-

tes. Essas técnicas caracterizam-se pela simplicidade e velocidade da sexagem, que varia de uma a duas horas (KOBAYASHI *et al.*, 1998; KARAWASAKI *et al.*, 2000). Permitem, ainda, o uso simultâneo de várias cores (VELDMAN *et al.*, 1997). Isto faz com que possam se identificar individualmente os cromossomos (RIED *et al.*, 1992), e além da sexagem possam ser estudadas características genotípicas associadas a doenças genéticas ou produtivas (ZHANG *et al.*, 2000).

B.3) PROBLEMAS COMUNS DAS TÉCNICAS INVASIVAS DE SEXAGEM DE EMBRIÕES

Os danos produzidos pelas biópsias de embriões, ocorrem tanto na massa celular interna como na zona pelúcida (ZP) do embrião. As lesões na massa embrionária dependem do número de blastômeros a serem retirados; quantas mais células, pior o prognóstico da viabilidade embrionária. Embora seja possível realizar a identificação do sexo do embrião utilizando um único blastômero (CHRENEK *et al.*, 2001; GAVIO *et al.*, 2001), o risco de perder a biópsia é considerável (LAKASE *et al.*, 1996; BREDBACKA, 2001). Outro problema de empregar amostras de um único blastômero é que ele pode ser caracterizado como do sexo oposto. Com efeito, YOSHIZAWA *et al.* (1999) encontraram algum grau de mosaicismos sexual em 15% dos embriões bovinos cariotipados e KATAGIRI e KATAYAMA (1996) em 40% dos embriões humanos analisados por PCR. Esses autores recomendaram não utilizar amostras

com menos de dois blastômeros. Por outro lado, embriões sem ZP, ou com a ZP lesada, além de reduzir sua capacidade de criopreservação (SHEA, 1999; EL GAYAR *et al.*, 2001) são passíveis de contaminação por agentes virais. Por essa razão, as normas sanitárias recomendadas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões proíbem o comércio internacional de embriões cuja ZP não esteja intacta.

USO COMERCIAL DA SEXAGEM DE EMBRIÕES

A simplicidade da técnica de PCR e seus bons resultados fazem dela o método mais usado para determinar o sexo embrionário em bovinos. Estudos realizados a campo em grande número de animais no Canadá (SHEA, 1999), na França (NIBART, 1996) e na Alemanha (ROSCHLAU *et al.*, 1997; GELDHOF *et al.*, 2000) revelaram valores altos tanto na sua eficiência (90-95%) quanto na sua exatidão (93-99%). As taxas de prenhez (TP) após transferência de embriões "sexados" são semelhantes às obtidas com embriões intatos. Por exemplo, GELDHOF *et al.* (2000) obtiveram uma TP de 45% após transferência de embriões bovinos sexados e congelados e de 56% com embriões frescos transferidos após sexagem.

No Brasil, a técnica de PCR para determinação do sexo nos embriões bovinos já tem relevância comercial (LOPES *et al.*, 2001). Profissionais autônomos e empresas brasileiras de biotecnologia da reprodução oferecem serviços para realizar a sexagem de embriões a nível comercial, com níveis de exatidão de 95-100% para embriões machos e de 85-90% para fêmeas, com taxas de prenhez da ordem de 53% (ARAUCÁRIA, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde 1980, o uso das técnicas de PCR e de ISH não para de crescer, abrangendo múltiplos ramos das ciências biológicas. Na reprodução animal, elas oferecem a possibilidade de identificar (e consequentemente escolher) o sexo dos embriões. Além da determinação do sexo embrionário, as técnicas de PCR e de ISH (particularmente da FISH), e a combinação delas vão continuar sendo ferramentas indispensáveis na hora de realizar análises cromossômicas mais detalhadas. Já a análise citogenética, devido a sua alta exatidão, mais a sua falta de rapidez, permanecerá com certeza como mé-

todo de referência das demais técnicas de determinação do sexo no âmbito do laboratório.

Provavelmente as técnicas de determinação do sexo dos embriões perderão importância no momento em que a sexagem de sêmen estiver comercialmente disponível, devido à maior flexibilidade de uso e facilidade de aplicação. Até lá, a sexagem embrionária pode se tornar uma ferramenta interessante, particularmente em fazendas bem manejadas, capaz de agregar valor ao negócio da pecuária.

AGRADECIMENTOS

À Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce (Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina) pela concessão de afastamento do primeiro autor junto ao Instituto de Zootecnia, em Nova Odessa, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, GP., ALVAREZ, RH. Métodos de separação do sexo de espermatozoides. estado atual do conhecimento e implicações na produção animal. Bol. Industr. anim., Nova Odessa, 2003.
- ANDERSON, G.B. Identification of embryonic sex by detection of HY antigen. Theriogenology, Los Altos, v.27, n.1, p.81-97, 1987.
- ARAUCÁRIA. Pecuária pode planejar sexo do rebanho. Araucária em Revista, n. março-abril, p.10-11, 2002.
- AVERY, B.; MADISON, V., GREVE, T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. Theriogenology, Los Altos, v.35, p.953-963, 1991.
- AVERY, B., SCHMIDT, M., GREVE, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. Acta Vet. Scand., Copenhagen, v.30, p.147-153, 1989.
- BERG, U., REICHENBACH, H.D., LIEBRICH, J. et al. Sex ratio of calves born after transfer of in vitro produced embryos. Theriogenology, Los Altos, v.37, p.191, 1992. (Abst).
- BERNARDI, M.L., DELOUIS, C. Sex-related differences in the developmental rate of in vitro mated/ in vitro fertilized ovine embryos. Human Reprod., v.11, p.621-626, 1996.
- BETTERIDGE, K.J. Livestock embryo sexing: past, present and future. In: WACHTEL, S.S. (Ed.) Evolutionary

- mechanisms in sex determination. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989. p.279-289.
- BETTERIDGE, K.J. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, Los Altos, v.29, p.155-187, 1988.
- BLECHER, S.R., HOWIE, R., LI, S. et al. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, Los Altos, v.52, p.1309-1321, 1999.
- BONDIOLI, K.R. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J Anim Sci., Champaign*, v.70, Supp.2, p. 19-29, 1992.
- BRAND, A., DROST, M. Embryo collection by non-surgical methods. In *Embryo transfer in farm animals. A review on techniques and applications*, BETTERIDGE, K.J. (Ed.) Agriculture Canada, p.16-19, 1977a. (Monograph, n.16)
- BRAND, A., DROST, M. Embryo transfer by non-surgical methods. In *Embryo transfer in farm animals. A review on techniques and applications*, BETTERIDGE, K.J. (Ed.) Agriculture Canada, p. 31-34, 1977b. (Monograph n.16)
- BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, n.1, p.23-34, 2001.
- BREDBACKA, P., KANKAANPAA, A., PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology*, Los Altos, v.44, n.2, p.167-176, 1995.
- BURGOYNE, P.S. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. *Development*, v.117, p.341-345, 1993.
- CARVALHO, R.V., DEL CAMPO, M.R., PALASZ, A.T. et al. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*, Los Altos, v.45, p.489-498, 1996
- CASSAR, G., KING, A.W., KING, G.J. Influence of sex on early growth of pig conceptuses. *J. Reprod. Fert., Cambridge*, v.101, p. 317-320, 1994.
- CHRENEK, P., BOULANGER, L., HEYMAN, Y. et al. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, n.5, p.1071-1081, 2001.
- COTINOT, C., GIANQUINTO, L., FELLOUS, M. Le déterminisme du sexe: son contrôle génétique. In THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. (Eds.). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Ellipses, 1991. p.205-219.
- EL GAYAR, M., KOLBE, T., BRENIG, B. et al. Micromanipulation and sexing of caprine embryos. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, p.499, 2001 (Abstr.).
- EPSTEIN, C.J., SMITH, S., TRAVIS, B. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*, v.15, p.63-68, 1980.
- FIRST, N.L., PARRISH, J.J. *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert., Cambridge*, v.34, (suppl.), p.151-165, 1987.
- GALBRAITH, G.M.P., GALBRAITH, R.M., FAULK, W.P. et al. Detection of H-Y antigen by fluorescence microscopy. *Transplantation*, v.26, p.25-27, 1978.
- GALL, J.G., PARDUE, M.L. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.64, p.600-604, 1969.
- GAVIO, D., FERNANDES, M.B., VILLA, R.A. et al. Aplicação do método de FISH para determinação do sexo em embriões zebuínos produzidos in vitro. *Rev. bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*, v.25, p.404-406, 2001.
- GELDHOF, A., GOOSSENS, L., MOYAERT, I. et al. Sex determination in bovine embryos by micro-aspiration: technical aspects and results under farm conditions. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, p.479, 2000. (Abstr.).
- GLICK, B.R., PASTERNAK, J.J. *Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*. Washington: ASM Press, 1994. 500 p.
- GOSDEN, J.R., MITCHELL, A.R., GOSDEN, C.M. et al. Direct vision chorion biopsy and chromosome-specific DNA probes for determination of fetal sex in first-trimester prenatal diagnosis. *Lancet*, v.2, p. 1416-1419, 1982.
- GRISART, B., MASSIP, A., COLLETTE, L. et al. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology*, Los Altos, v.43, p.1097-1106, 1995.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., BEHBOODI, E., ANDERSON, G.B. et al. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology*, Los Altos, v.46, p.515-525, 1996.

- HALL, B.D., SPIEGELMAN, S. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.47, p.137, 1961.
- HARE, W.C.D., BETTERIDGE, K.J. Relationship of embryo sexing to other methods of prenatal sex determination in farm animals: a review. *Theriogenology*, Los Altos, v.9, n.1, p.27-43, 1978.
- HARE, W.C.D., MITCHELL, D., BETTERIDGE, K.J. et al. Sexing 2-week-old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results. *Theriogenology*, Los Altos, v.5, p.243-253, 1976.
- HERR, C.M., REED, K.C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, Los Altos, v.21, n.1, p.7-17, 1991.
- HUHTINEN, M., PEIPPO, J., BREDBACKA, P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology*, Los Altos, v.48, p.361-367, 1997.
- JOHN, H., BIRNSTEIL, M.L., JONES, K.W. RNA-DNA hybrids at cytological levels. *Nature*, London, v.223, p.582, 1969.
- JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p. 93-107, 2000.
- KARAWASAKI, T., MATSUMOTO, K., MUROFUSHI, J. et al. Sexing of porcine embryos by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, p.1501-1509, 2000.
- KATAGIRI, Y., KATAYAMA, S. Influence of mosaicism on sexing of human preembryos detected by the polymerase chain reaction. *J. Assist. Reprod. Gen.*, v.13, p.586-591, 1996.
- KING, WA. Sexing embryos by citological methods. *Theriogenology*, Los Altos, v.21, n.1, p.7-17, 1984.
- KOBAYASHI, J., SEKIMOTO, A., UCHIDA, H. et al. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.390-394, 1998.
- KRCO, C.J., GOLDBERG, E.H. Detection of H-Y (male) antigen on 8-cells mouse embryos. *Science*, London, v.193, p.1134-1135, 1976.
- LACAZE, S., LESCLAUX, J., COUPET, H. The sexing of bovine embryos in the South-West of France: influence of size of biopsy on sexing efficiency and pregnancy rates. 12th AETE Annual Meeting, Proceedings. AETE, 1996. p.158 (abstr.).
- LAZZARI, G., LANDRISCINA, R., DUCHI, R. et al. Sex shift in calves derived from IVM-IVF embryos cultured in the sheep oviduct versus calves produced by conventional superovulation and embryo transfer. *Theriogenology*, Los Altos, v.43, p.263, 1995 (Abstr.).
- LEONARD, M., KIRSZENBAUM, M., COTINOT, C. et al. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific probes. *Theriogenology*, Los Altos, v.27, p.248, 1987. (Abstr.).
- LIMA, V.F.M.H., JORGE, W., DE BEM, A.R. et al. Sex determination of murine and bovine embryos using cytotoxicity and immunofluorescence assays. *Theriogenology*, Los Altos, v.39, p.1343-1352, 1993.
- LONERGAN, P., KHATIR, H., PIUMI, F. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the development characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.117, p.159-167, 1999.
- LOPES, R.F., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T. et al. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, Los Altos, v.56, p.1383-1392, 2001.
- LYON, M.F. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.*, v.47, p.1-35, 1972.
- Mc PHERSON, M.J., QUIRKE, P., TAYLOR, G.R. PCR: a practical approach. Oxford: Oxford Univ. Press, 1991. 253 p.
- MONK, M., HANDYSIDE, A.H. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.82, p.365-368, 1988.
- MONK, M., HARPER, M. X-chromosome activity in preimplantation mouse embryos from XX and XO mothers. *J. Embryol. Exp. Morph.*, v.46, p.53-64, 1978.
- MONK, M., KATHURIA, H. Dosage compensation for an X-linked gene dosage in preimplantation mouse embryos. *Nature*, London, v.270, p.599-601, 1977.
- MONTGOMERY, K.D., KEITGES, E.A., MEYNE, J. Molecular cytogenetics: definitions, clinical aspects and protocols. In BARCH, MJ, KNUTSEN, T, SPURBECK,

- J. (Eds.). The AGT cytogenetics laboratory manual . 3. Ed.. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers,1997. p.557-589.
- MOREIRA-FILHO, C.A., RAMALHO, M.D.T., KIRSZENBAUM, M. et al. Sex selection of brazilian zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, p.483, 2000. (Abstr.).
- MOREL, G. (Ed.). Hybridization techniques fo electron microscopy. Boca Raton: CRC Press Inc.,1993. 349 p.
- NIBART, M. Le programme français du sexage des embryons bovins. *Elevage et Insémination*, Paris, v.271, p.10-18, 1996.
- PARK, J.H., LEE, J.H., CHOI, K.M. et al. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex PCR with biopsied single blastomere. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, p.1843-1853, 2001.
- PEGORARO, L.M.C., LIMA, V.F.H. Selección del sexo en mamíferos. In: PALMA, G.A. (Ed.). *Biología de la Reproducción*. Balcarce: Ediciones INTA, 2001. p. 317-351.
- PERRETT, C.W. The molecular principles of in situ hybridization. In :MOREL, G. (Ed.). *Hybridization techniques of electron microscopy*. Boca Raton: CRC Press Inc.,1993. p.13-44.
- RAMALHO, M.D.T., ALVES, B.C., MOREIRA-FILHO, C.A. et al. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high titer H-Y antisera. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, p.484, 2000. (Abstr.).
- RAO, K.B.C.A., TOTTEY, S.M. Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of in-vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology*, Los Altos, v.51, p.785-797, 1999.
- RAY, P.F., CONAGHAN, J., WINSTON, R.M.L. et al. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.104, p.165-171, 1995.
- RIED, T., LANDES, G., DACKOWSKI, W. et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum. Mol. Genet.*, v.1, p.307-313, 1992.
- RIEGER, D. The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryos. *Theriogenology*, Los Altos, v.21, p.138-149, 1984.
- ROSCHLAU, K., ROSCHLAU, D., ROSELIUS, R. et al. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology*, Los Altos, v.47, p.273, 1997.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, London, v.239, p.487-491, 1988.
- SCHRODER, A., MILLER, J.R., THOMSEN, P.D. et al. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.*, v.1, p.121-123, 1990.
- SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, P. *Practical in situ hybridization*. Oxford: Bios Scientific Publishers, Ltd., 2000. 203 p.
- SEIDEL, G.E., ELSDEN, R.P. *Embryo transfer in dairy cattle*. Fort Atkinson, Wisconsin: W.D. Hoard and Sons Company, 1997. 103 p.
- SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*, Los Altos, v.51, p.841-854, 1999.
- SIMPSON, E., CHANDLER, P., GOULMY, E. et al. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination of on human Y chromosome. *Nature*, London, v.326, p.876-878, 1987.
- TAKAGI, N. Preferencial inactivation of the paternally derived X chromosome in mice. In: RUSSELL, L.B. (Ed.). *Genetic mosaic and chimeras in mammals*. New York: Plenum Press, 1978. p.341-360
- THIBIER, M, NIBART, M. Bovine embryo sexing by a DNA probe on the field. *Reprod. Dom. Anim.*, v.27, p.29-33, 1992.
- TSUNODA, Y., TOKUNAGA, T., SUGLE, T. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos. *Gam. Res.*, v.12, p.301-304,1985.
- UTSUMI, K., HAYASHI, M., TAKAKURA, R. et al. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.34, p.25-32, 1993.

- UTSUMI, K., SATOH, E., IRITANI, A. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *J. Exp. Zool.*, v.260, p.9-105, 1991.
- UTSUMI, K., SATOH, E., YUHARA, M. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. *Proc. 10th Int. Cong. Anim. Reprod. and AI, U. of Illinois, Urbana, Ill., USA, 1984.* p.234 (Abstr.).
- UTSUMI, K., SATOH, E., YUHARA, M. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. *Proc. 2nd Int. Cong. Reprod. Immun., Kyoto, Japão, 1983.* p.59 (Abstr.).
- VALDIVIA, R.P., KUNEIDA, T., AZUMA, S. et al. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in-vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v.35, p.121-126, 1993.
- VANDEKKEEN, H., BRAKENHOFF, G.J., BAUMAN, J.G.J. DNA in situ hybridization and confocal microscopy. In: MOREL, G. (Ed.). *Hybridization techniques for electron microscopy.* Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. p.65-97.
- VAN VLIET, R.A., GIBBINS, A.M.V., WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology, Los Altos*, v.32, p.421-438, 1989.
- VELDMAN, T.A., KNUTSEN, T., NING, Y. et al. Spectral karyotyping. In: BARCH, M.J., KNUTSEN, T., SPURBECK, J. (Eds.). *The AGT cytogenetics laboratory manual.* 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.591-595.
- WACHTEL, S.S. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology, Los Altos*, v.21, n.1, p.18-28, 1984.
- WATSON, J., GILMAN, M., WITKOWSKI, J. et al. *Recombinant DNA.* 2. ed. New York: W.H. Freeman & Co., 1992. 626 p.
- WHITE, K.L., ANDERSON, G.B., BERGER, T.J. et al. Identification of a male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryos. *Gam. Res.*, v.17, p.107-113, 1987a.
- WHITE, K.L., ANDERSON, G.B., BONDURANT, R.H. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v.37, p.867-873, 1987b.
- WHITE, K.L., ANDERSON, G.B., PASHEN, R.L. et al. Detection of histocompatibility-Y (H-Y) antigen: identification of sex of preimplantation ovine embryos. *J. Reprod. Immunol.*, v.10, p.27-32, 1987c.
- WHITE, K.L., BRADBURY, M.W., ANDERSON, G.B. et al. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. *Theriogenology, Los Altos*, v.21, p.272, 1984. (Abstr.).
- WHITE, K.L., LINDNER, G.M., ANDERSON, G.B. et al. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology, Los Altos*, v.19, p.701-705, 1983.
- WILLIAMS, T.J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme,