

PRODUÇÃO *IN VITRO* E BIÓPSIA EMBRIONÁRIA PARA SELEÇÃO GENÔMICA

Luiz Sergio de Almeida Camargo^{1*}
Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva¹
Clara Slade Oliveira²
Ana Cristina da Silva Figueiredo³
João Henrique Moreira Viana¹

INTRODUÇÃO

A tecnologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) surgiu como uma alternativa para a produção de embriões *in vivo* (chamado Transferência de Embriões convencional - TE), em especial para as doadoras de alto valor que não respondiam à superovulação. No entanto, devido às suas vantagens, o uso da PIV no Brasil tem aumentado continuamente na última década, sendo responsável por mais de 360.000 embriões produzidos em 2013 (Viana e Figueiredo, 2015), e desde 2005 substituiu a TE como a técnica de escolha para a produção de embriões bovinos. O uso de PIV foi inicialmente predominante em raças zebuínas de corte, mas nos últimos anos também aumentou em gado de leite, especialmente em mestiços originados de cruzamento com raças de origem europeia (Viana e Figueiredo, 2015). Essa tendência coincide com o recente crescimento da PIV na Europa e América do Norte (56% e 48%, respectivamente, em 2013), e sugere que esta tecnologia pode tornar-se num futuro próximo, o método padrão para a produção de embriões em todo o mundo. Com exceção da Ásia, a aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (também conhecido como *ovum pick-up* ou OPU) tornou-se a principal fonte de oócitos para a PIV (em média, 94,7% dos embriões produzidos em 2013 foram de OPU), antes restrito principalmente a América do Sul (Perry, 2015). Entre as principais vantagens da técnica está a possibilidade de recuperação de oócitos repetidamente em curtos intervalos de tempo na mesma doadora, utilizando ou não tratamentos para sincronização do ciclo estral ou hormonais (Viana et al., 2003), reduzindo o tempo e custos necessários para produzir embriões para fins comerciais.

O surgimento a PIV também causou uma série de mudanças na indústria de embriões bovinos. Por exemplo, por causa de um efeito de escala no preço dos embriões, há uma tendência natural para empresas de PIV em aumentar a sua produção objetivando reduzir custos, e tem como consequência uma maior complexidade nas instalações, na logística e na linha de produção. A produção de embriões se tornou mais dinâmica, com diferentes equipes encarregadas de cada uma das etapas do processo (recuperação de oócitos, produção de embriões, transferência de embriões), mas ainda centralizadas nas principais instalações de PIV. Estas características da indústria moderna associada à crescente demanda de embriões PIV abrem novas perspectivas para seleção genômica, ou seja, a seleção de embriões de elevado mérito com base nos marcadores presentes em seu genoma. Os animais podem ser selecionados de acordo com o seu valor genômico (ou DEP genômica), que é calculado com alta precisão pela soma dos efeitos de substituição alélica dos marcadores presentes em todo o genoma. Touros jovens nos EUA, Canadá e Europa tem sido genotipados e selecionados com base na DEP genômica, reduzindo custos e intervalo de gerações quando comparado ao teste de progênie (Bouquet e Juga, 2013). A DEP genômica também pode ser usada para selecionar bezerras e novilhas de elevado mérito genético objetivando a reposição do rebanho, economizando tempo e dinheiro ao nível da fazenda. Pela integração da PIV e seleção genômica, embriões podem ser selecionados com base na sua DEP genômica e reduzir os custos com aquisição e manutenção de receptoras de embriões, além de encurtar o intervalo de geração. No entanto, para determinar a DEP genômica de embriões, células são removidas a partir dos embriões por procedimentos de biópsias que podem comprometer a viabilidade embrionária. Além disso, as células coletadas dos embriões devem ter material genômico (DNA) suficiente para a permitir a genotipagem e determinação da DEP genômica.

Esta revisão tem como objetivo apresentar a seleção genômica para embriões produzidos *in vitro* de bovinos e os fatores que podem influenciar a sua adoção com sucesso.

SELEÇÃO GENÔMICA

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: luiz.camargo@embrapa.br

Na busca pelo aumento da taxa de ganho genético dos rebanhos, as pesquisas em melhoramento genético têm incorporado as informações de marcadores moleculares que estejam associados à substancial variação genética de características de interesse econômico. Os primeiros trabalhos científicos sugerindo incorporar esta fonte de informação datam do final dos anos 80 e início da década de 90, e tinham como proposta acelerar o progresso genético através do aumento da acurácia de predição dos valores genéticos e redução do intervalo entre gerações pela seleção de animais mais jovens, baseado no conhecimento dos efeitos dos marcadores na expressão de um ou mais fenótipos de interesse.

Com os recentes avanços das técnicas e equipamentos para se extrair informações do DNA, como a genotipagem e o sequenciamento do genoma, grandes quantidades de marcadores moleculares tem sido prospectados a um custo relativamente baixo, propiciando a inclusão dessas informações ao processo de avaliação genética com o objetivo de torná-la ainda mais acurada. A possibilidade de identificar uma grande densidade de marcadores reacendeu o conceito de genômica, cunhado pelo geneticista Tom Roderick, em 1986, e fez surgir uma nova metodologia de avaliação genética, denominada seleção genômica, proposta por Meuwissen et al. (2001).

No contexto da produção animal, a genômica pode ser entendida como a ciência que pode identificar genes ou regiões genômicas envolvidas com a expressão das características de produção. Esta identificação é realizada por meio da associação não aleatória entre o marcador e o *loci* de característica quantitativas (*quantitative trait loci*; QTL). Se esta associação não aleatória entre o marcador e o QTL é forte, então pode-se utilizar esse marcador para inferir se um determinado animal carrega consigo uma variante gênica favorável (ou não) à expressão de um fenótipo de interesse econômico. A seleção genômica, por sua vez, explora a alta densidade de marcadores para capturar o efeito de todos os potenciais QTLs envolvidos com a expressão de um determinado fenótipo. A densidade de marcadores deve ser suficientemente alta para assegurar que os marcadores estejam em associação não aleatória com os QTLs, capturando o máximo da variabilidade genética. A partir desta pressuposição, a avaliação genética com o uso de alta densidade de marcadores produz a DEP genômica. A inclusão dos marcadores nas avaliações genéticas permite aumentar a acurácia de predição e, conseqüentemente, pré-selecionar touros jovens para entrar em teste de progênie com maior precisão, diminuir o número de progênies que precisam ser testadas para se obter um grau de acurácia satisfatório (redução de custos) e selecionar animais para as características expressas tardiamente na vida do animal, ou apenas em um dos sexos, ou de herdabilidade baixa, tais como a produção de leite e características reprodutivas.

Os marcadores utilizados em larga escala também podem auxiliar na eventual correção de parentesco porque pode estimar a proporção de alelos idênticos por descendência, o que também impacta a acurácia de predição do valor genômico, ou mesmo na realização de um teste de paternidade para registro genealógico.

BIOPSIAS EMBRIONÁRIAS

Técnicas de biópsias embrionárias tem sido utilizadas por muito tempo em tecnologias de reprodução assistida, principalmente em embriões humanos para o diagnóstico genético pré-implantacional (DGP) com o objetivo de detectar perturbações genéticas. Inicialmente, a biópsia seguida por DGP em embriões humanos foi utilizada para seleção do sexo a fim de evitar as doenças ligadas aos cromossomos sexuais, como retardo mental ligado ao X (Handyside et al., 1990), mas atualmente é indicada para detectar várias outras doenças genéticas, como a fibrose cística e a talassemia (Coco, 2014). Além de prevenir o nascimento de crianças com doenças genéticas, a técnica também é aplicada para identificar embriões apresentando distúrbios cromossômicos, como aneuploidias, com o objetivo de melhorar as taxas de gestação e nascimento em pacientes com potencial para subfertilidade (Harper e SenGupta, 2012). A estimativa é que mais de 10.000 crianças já nasceram a partir de embriões submetidos a biópsia seguida por DGP (Coco, 2014).

Em bovinos, como em humanos, biópsias embrionárias começaram a ser realizadas no final dos anos 80 em embriões produzidos *in vivo* (embriões TE). Atualmente, existem três métodos mais conhecidos para a realização de biópsia de embriões bovinos (Ponsart et al, 2014.): (i) aspiração, onde uma pipeta de aspiração penetra a zona pelúcida e então é aspirado algumas células (blastômeros); (ii) micro-lâmina de biópsia, onde uma micro-lâmina é usada para cortar os embriões e (iii) biópsia com agulha, em que a zona pelúcida é perfurada com uma agulha fina para rompê-la e, em seguida, uma pipeta de biópsia é inserida para aspirar as células. Em embriões humanos é comum promover o rompimento da zona pelúcida com ajuda de ácidos

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: luiz.camargo@embrapa.br

(como de Tyrode) ou de sistema de laser, para então se introduzir a pipeta de biópsia (Chatzimeletiou et al., 2005, Geber et al., 2011). Em todos os métodos, a preferência é remover apenas as células de trofocotoderma. Apesar dos relatos iniciais não encontrarem efeito da biópsia em embriões TE bovinos na taxa de gestação (50-60%), quando comparado aos controles (55-61%) em condições de campo (Lopes et al., 2001), um estudo recente demonstrou que o método de biópsia pode, de fato, influenciar a gestação. Cenariu et al. (2012) relataram maior taxa de gestação quando blastocistos TE foram biopsiados pelo método de agulha (57%) do que por aspiração (43%) ou micro-lâmina (31%). As biópsias de embriões bovinos são geralmente realizadas em estádios de mórula ou de blastocisto, uma vez que o estágio do embrião TE biopsiado parece não ser importante para a sua viabilidade. Cenariu et al. (2012) e Lacaze et al. (2008) não encontraram efeito significativo na taxa de gestação entre mórula e blastocistos biopsiados, apesar de um estudo anterior (Lacaze et al., 2009) relatar uma tendência ($P = 0,07$) de blastocistos biopsiados em alcançarem um maior taxa de gestação (66,7%) do que mórula biopsiadas (55,8%). Por outro lado, a qualidade dos embriões é um fator crítico. Os embriões TE classificados em grau 1 (qualidade excelente ou bom) resultam em taxas de gestação maiores que embriões com grau 2 (qualidade regular) (Bredbacka, 1998). Thibier e Nibart (1995) relataram 53% de taxa de gestação ao transferirem embriões biopsiados grau 1 ao contrário de 34% ao transferirem embriões grau 2.

O interesse inicial por biópsia embrionária foi principalmente para a determinação do sexo de embriões TE (Thibier e Nibart, 1995, Shea, 1999). Na década de 2000, com o avanço da sexagem espermática e da PIV pouco se estudou sobre biópsias embrionárias em bovinos, diferentemente de embriões humanos, onde a DGP assumiu um papel essencial na previsão de componentes genéticos envolvidos em doenças. Assim, em humanos foram executados diversos estudos sobre métodos mais eficazes e fatores que influenciam a viabilidade do embrião biopsiado. Com o surgimento da seleção genômica, o interesse por biópsias embrionárias em bovinos retornou, mas agora com aplicação direcionada a embriões PIV. Várias empresas comerciais produzem mais de milhares de embriões a cada mês que poderiam ser biopsiados e selecionados para características desejáveis antes mesmo de serem transferidos para receptoras. No entanto, o sistema de cultivo embrionário *in vitro* é ainda sub-ótimo e pode causar perturbações no metabolismo e expressão gênica de embriões produzidos *in vitro* (Lonergan et al., 2003, Camargo et al., 2006, De Sousa et al., 2015), tornando-os mais sensíveis do que embriões TE. Devido a esses efeitos do ambiente *in vitro* e uma maior sensibilidade embrionária, uma preocupação é a viabilidade pós-biópsia de embriões PIV, embora alguns estudos da década de 90 terem obtido razoável sucesso ao avaliarem embriões PIV biopsiados (Kirkpatrick e Monson, 1993, Bredbacka et al., 1995). Contudo, considerando que diversos fatores podem influenciar a viabilidade embrionária, como por exemplo o meio e os suplementos utilizados para o cultivo dos embriões antes e após a biópsia (Lasiene et al., 2006, Pereira et al. 2008), a aplicação de biópsias em embriões PIV ainda requer estudos para uso em escala comercial.

Um outro aspecto que interfere para o estabelecimento de uma rotina de biópsia embrionária na PIV é a criopreservação de embriões. A criopreservação de embriões PIV não biopsiados ainda não é considerada um sucesso quando comparada àquela com embrião TE (Hasler, 2014). Apesar de alguns estudos relatarem bons resultados considerando gestações (Xu et al., 2006, Sanches et al., 2013) e vários métodos disponíveis, como a vitrificação, congelamento lento e suas variações (Vajta e Nagy, 2006, Saragusty e Arav de 2011, Bruyere et al., 2012), a criopreservação de embriões PIV não é amplamente adotada por empresas comerciais, possivelmente devido a menor viabilidade deste tipo de embrião comparado ao embrião TE e da falta de padronização de protocolos de criopreservação. Essas dúvidas tornam mais difícil a decisão de criopreservar o embrião PIV biopsiado, que é supostamente mais sensível que o embrião não biopsiado. Infelizmente existem poucos estudos com foco na criopreservação de embriões PIV bovinos submetidos a biópsia em qualquer estágio do desenvolvimento. Os estudos disponíveis apresentam diferentes metodologias e um número limitado de embriões, dificultando a tomada de decisão por qual método adotar. Suzuki et al. (1995) avaliaram o desenvolvimento *in vitro* de blastocistos PIV biopsiados no oitavo dia pós-fecundação e congelados com 1,8 M etilenoglicol mais 0,05 M trealose e 20% de polivinilpirrolidona e encontraram alta taxa de viabilidade e re-expansão *in vitro* (90%; 18/20 embriões) pós-descongelamento. Tominaga et al. (2007) também avaliaram a viabilidade *in vitro* pós-descongelamento de blastocistos PIV biopsiados e encontraram melhores resultados (91,3%; 21/23 embriões) com 0,7 M glicerol mais 0,05-0,1 M de sacarose usando o método de congelamento lento. Agca et al. (1998) biopsiaram embriões PIV na fase de mórula no quinto dia pós-fecundação, cultivaram-os até o sétimo dia quando então os criopreservaram pelos métodos de vitrificação ou de congelamento lento. Este estudo obteve sete gestações (44%; 07/16) após a vitrificação

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: lui.camargo@embrapa.br

e três gestações (23%; 3/13) após o congelamento, sugerindo a vitrificação como melhor método de criopreservação. Apesar de importantes, os dados dos estudos disponíveis atualmente não são suficientes para se chegar a uma conclusão sólida sobre a eficiência da criopreservação de embriões PIV biopsiados, de modo que a investigação a partir de diferentes laboratórios e sob diferentes condições é necessária. Sem a possibilidade de criopreservação, o embrião PIV biopsiado deve ser transferido a fresco, antes que o produtor receba o resultado do valor genômico.

Uma tentativa para superar o problema com a criopreservação de embriões PIV biopsiados é a realização de biópsias em estádios mais precoces, em embriões com cerca de 8-16 células (com três ou quatro dias pós-fecundação), de forma semelhante ao realizado com embriões humanos, e cultivá-los *in vitro* até alcançarem o estágio de blastocisto. Este procedimento poderia dar tempo suficiente para que a genotipagem e o cálculo da DEP genômica fossem concluídas antes da transferência dos embriões para receptoras, o que ocorre em sete ou oito dias após a fecundação. Kubisch e Johnson (2007) relataram que 33,7% dos embriões biopsiados no terceiro dia pós-fecundação desenvolveram até estágio de blastocistos. O nosso grupo observou que após a realização de biópsias no dia quatro pós-fecundação, 53,3% dos embriões progrediram para estágio de blastocisto (Polisseni et al. 2010). Em ambos os estudos, o desenvolvimento de embriões biopsiados foi semelhante ao do grupo de controle. O inconveniente desta abordagem é a dificuldade em prever qual embrião nesses estádios iniciais (8-16 células) vai desenvolver para o estágio de blastocisto. Em nosso estudo, isso significou que, com aproximadamente 50% de sucesso, dois embriões biopsiados teriam a DEP genômica calculada mas apenas um alcançaria o estágio de blastocisto para ser transferido para a receptora.

Na prática, os métodos utilizados para biópsia de embriões TE podem ser aplicados para os embriões PIV, mas o técnico deve ter em mente as diferenças entre embriões PIV e TE, como o número total de células e maior sensibilidade às condições do ambiente. Ou seja, a biópsia de embriões PIV deve ser suficiente para prover material genético para a avaliação genômica, porém ser o menor possível para evitar prejudicar o desenvolvimento do embrião e futura gestação. Como relatado acima, a biópsia de embriões TE pode ser realizada em embriões em estágio de mórula e de blastocisto, no entanto, na PIV a preferência tem sido dada ao estágio de blastocisto no sétimo dia pós-fecundação. Há algumas razões para isto, como o baixo número de células e menor compactação celular nos embriões em estádios de mórula. E, finalmente, sem métodos de criopreservação confiáveis, os embriões submetidos a biópsia devem ser transferidos a fresco para as receptoras enquanto a genotipagem é realizada e a DEP genômica calculada, o que pode demorar alguns dias.

GENOTIPAGEM EMBRIONÁRIA

A genotipagem embrionária é o método responsável pela identificação dos marcadores do DNA, o que possibilita a seleção de embriões com base na DEP genômica ou até mesmo com base na presença de genes individuais (como genes de caseína ou Blad). No entanto, existem duas grandes preocupações sobre genotipagem do embrião: qualidade e quantidade da amostra na biópsia, que podem influenciar a qualidade e eficiência da genotipagem (isto é, a capacidade de detecção de polimorfismo de base única [SNP]; *call rate*) e consequentemente a concordância da DEP genômica entre as amostras dos embriões biopsiados e com as dos bezerros derivados desses embriões. Como embriões possuem poucas células (blastocistos no sétimo dia pós-fecundação possuem cerca de 120 células) uma biópsia embrionária não deve ter mais de 20 células e por isso não possuirá DNA genômico suficiente para obter uma genotipagem com alta qualidade. Para superar esta limitação de material genômico é necessário amplificar o DNA, o que é feito usando a técnica de *whole genome amplification* (amplificação total do genoma - WGA), de modo que a quantidade de DNA disponível atenda o requerimento mínimo exigido pelas plataformas de genotipagem. Em estudo anterior, mostramos que o DNA genômico obtido de duas a quatro células de embriões bovinos em estádios de 8-16 células pode ser amplificado com êxito utilizando WGA com o objetivo de análises de genes específicos (Polisseni et al., 2010) e essa mesma abordagem foi adotada em outro estudo para genotipagem (Le Bourhis et al., 2011). Ainda assim, existe a preocupação do impacto da WGA na análise genômica global, principalmente devido a uma amplificação incompleta e introdução de mutações pontuais ou desequilíbrios (como alelos *drop-out* e *drop-in*), que poderiam reduzir a eficiência da genotipagem e aumentar a taxa de erro. A consequência seria uma DEP genômica incorreta para os embriões, resultando em não-concordância com a DEP genômica do bezerro derivado daquele embrião biopsiado.

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: lui.camargo@embrapa.br

Estudo recente avaliou diferentes abordagens para a WGA (Shojaei Saadi et al., 2014) e verificou que os métodos baseados na técnica de *multiple displacement amplification* (MDA-amplificação com deslocamento múltiplos) geraram os melhores resultados em termos de eficiência (99,5% e 99,7% para os kits GenomiPhi da GE e Repli-g da Qiagen, respectivamente) e de taxa de erro (10,7% e 6,5% para GenomiPhi e Repli-g, respectivamente) quando utilizando quantidade de DNA genômico mais elevada (10 ng). Quando utilizado menores quantidades de DNA genômico, as técnicas avaliadas, de modo geral, apresentaram menores eficiência e maiores taxas de erro. Os autores observaram que apesar da amplificação, pode ser necessário recorrer a imputação genômica baseada no genótipo dos pais ou da raça para corrigir eventuais erros de genotipagem. Com isso alcançaram uma concordância de 99,9% entre os valores genômicos estimados a partir de biópsias embrionárias e os valores genômicos dos bezerros correspondentes. Em outro estudo com biópsia embrionária e WGA, Sargolzaei et al. (2013) encontraram uma correlação de 97,5% e 99,1% entre os valores genômicos dos embriões e dos bezerros derivados desses embriões (n = 56) antes e depois da imputação, respectivamente. Le Bourhis et al. (2012) também relataram após imputação uma elevada concordância de DEP genômica (acima de 98,9%) entre embriões e os bezerros correspondentes. Com base nesses estudos, a genotipagem de todo o genoma de amostras de embriões pode ser realizada após WGA e com o uso da imputação genômica, resultando em alta concordância da DEP genômica entre os embriões e os bezerros gerados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos benefícios da integração de produção *in vitro* de embriões bovinos com seleção genômica será a redução de custos com receptoras, uma vez que apenas os embriões com o valor genômico ou uma característica genética específica serão transferidos. No Brasil, apesar da disponibilidade comercial de rebanhos de receptoras de embriões, o custo de cada receptora e sua manutenção durante a gestação é limitante para a maioria dos produtores, o que torna atraente a genotipagem embrionária para seleção genômica em um sistema de produção *in vitro* de embriões. Além disso, os produtores poderão ter em sua fazenda apenas bezerras de mérito genético superior para a reposição do rebanho, reduzindo custos de criação e favorecendo o melhoramento genético.

Embora exista um grande mercado de embriões PIV no Brasil e os benefícios da seleção genômica, ainda há uma restrição na oferta comercial de genotipagem de embriões PIV. Há várias razões para isso, por exemplo: procedimentos de biópsias e amplificação total do genoma requer uma infraestrutura e equipamentos além de técnicos com alta habilidade em micromanipulação embrionária; os procedimentos para a biópsia não estão bem estabelecidos para embriões de PIV, bem como métodos de criopreservação; o lapso de tempo entre a biópsia de embrião e os resultados da DEP genômica é considerável; o preço de genotipagem ainda é elevado para a maioria dos produtores e estes ainda não estão totalmente conscientes dos benefícios de genotipagem do embrião para seu rebanho. No entanto, a genotipagem embrionária tem sido aplicado em outros países. Empresas comerciais como CRV na Holanda, Evolution na França e Masterrind na Alemanha, tem aplicado a genotipagem em embriões de TE e PIV em seus programas de melhoramento genético. A perspectiva é que, com o avanço da seleção genômica, mais grupos de pesquisa estarão interessados em melhorar a eficiência da biópsia e a os métodos para genotipagem embrionária e mais laboratórios comerciais de produção *in vitro* estarão interessados em oferecer serviços de genotipagem. Considerando-se as centenas de milhares de embriões de bovinos sendo produzidos *in vitro* a cada ano, um novo mercado com embriões PIV genotipados deve surgir e oferecer novas oportunidades para os produtores melhorarem o seu rebanho.

REFERÊNCIAS

- AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; PESCHEL, D.E.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. **Theriogenology**, v.50, p.129-145, 1998.
- BOUQUET, A.; JUGA, J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. **Animal**, v. 7, p.705-713, 2013.
- BREDBACKA, P.; KANKAANPÄÄ, A.; PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol.

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: luiz.camargo@embrapa.br

- Theriogenology**, v.44, p.167-176, 1995.
- BREDBACKA, P. Recent developments in embryo sexing and its field application. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.38, p.605-613, 1998.
- BRUYÈRE, P.; BAUDOT, A.; GUYADER-JOLY, C.; GUÉRIN, P.; LOUIS, G.; BUFF, S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. **Theriogenology**, v.78, p.1294-1302, 2012.
- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod.**, v.3, p.19-28, 2006.
- CENARIU, M.; PALL, E.; CERNEA, C.; GROZA, I. Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2012, artigo ID:541384, 2012.
- CHATZIMELETIOU, K.; MORRISON, E.E.; PANAGIOTIDIS, Y.; PRAPAS, N.; PRAPAS, Y.; RUTHERFORD, A.J.; GRUDZINSKAS, G.; HANDYSIDE, A.H. Comparison of effects of zona drilling by non-contact infrared laser or acid Tyrode's on the development of human biopsied embryos as revealed by blastomere viability, cytoskeletal analysis and molecular cytogenetics. **Reprod. Biomed. Online**, v.11, p.697-710, 2005.
- COCO, R. Repro genetics: Preimplantation genetics diagnosis. **Genet. Mol. Biol.**, v.37, p.271-284, 2014. Supl.
- DE SOUZA, D.K.; SALLES, L.P.; ROSA E SILVA, A.A. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.48, p.191-197, 2015.
- GEBER, S.; BOSSI, R.; LISBOA, C.B.; VALLE, M.; SAMPAIO, M. Laser confers less embryo exposure than acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis cycles: a randomized study. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.9, p.58, 2011.
- HANDYSIDE, A.H.; KONTOGIANNI, E.H.; HARDY, K.; WINSTON, R.M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. **Nature**, v.344, p.768-770, 1990.
- HARPER, J.C.; SENGUPTA, S.B. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. **Hum. Genet.**, v.131, p.175-186, 2012.
- HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v.81, p. 152-169, 2014.
- KIRKPATRICK, B.W.; MONSON, R.L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.335-340, 1993.
- KUBISCH, H.M.; JOHNSON, K.M. The effects of blastomere biopsy and oxygen tension on bovine embryo development, rate of apoptosis and interferon-tau secretion. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.509-515, 2007.
- LACAZE, S.; HUMBLLOT, P.; PONSART, C. Sexage et transfert direct d'embryons bovins biopsies et congelés en ferme dans un programme commercial. In: Rencontres Rech. Ruminant, 15^e, 2008, Paris. **Proceedings...** Paris: INRA. Disponível em <<http://www.journees3r.fr/spip.php?article2741>>. Acesso em: 23 março de 2015.
- LACAZE, S.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Influence of embryo stage on pregnancy rates following transfer of bovine biopsied embryos under on-farm conditions. In: Scientific Meeting of AETE, 25th, 2009, Poznan. **Proceedings...** Poznan: AETE, 2009, p.208. Disponível em <http://www.aete.eu/pdf_publication/28.pdf> Acesso em: 23 março de 2015.
- LASIENE, K.; VALANCIUTE, A.; LASYS, V.; VITKUS, A.; TUSAS, S. The influence of medium on viability of bovine morulae produced in vitro after their biopsy. **Pol. J. Vet. Sci.**, v.9, p.195-199, 2006.
- LE BOURHIS, D.; MULLAART, E.; SCHROOTEN, C.; FRITZ, S.; COPPIETERS, W.; PONSART, C. Breeding values concordance between embryos and corresponding calves. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.24, p.180, 2012.
- LE BOURHIS, D.; MULLAART, E.; HUMBLLOT, P.; COPPIETERS W.; PONSART, C. Bovine embryo genotyping using a 50k single nucleotide polymorphism chip. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.197, 2011.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Domest. Anim.**, v.38, p.259-267, 2003.

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: luiz.camargo@embrapa.br

- LOPES, R.F.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.; RODRIGUES, J.L. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. **Theriogenology**, v.56, p.1383-1392, 2001.
- MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v.157, p.1819-1829, 2001.
- PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; PEREIRA, M.S.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v.106, p.322-332, 2008.
- PERRY, G. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. March, p. 44-55, 2015.
- POLISSENI, J.; SÁ, W.F.; GUERRA, M. de O.; MACHADO, M.A.; SERAPIÃO, R.V.; CARVALHO, B.C.; CAMARGO, L.S.; PETERS, V.M. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. **Fertil Steril.**, v. 93, p.783-8, 2010.
- PONSART, C.; LE BOURHIS, D.; KNIJN, H.; FRITZ, S.; GUYADER-JOLY, C.; OTTER, T.; LACAZE, S.; CHARREAUX, F.; SCHIBLER, L.; DUPASSIEUX, D.; MULLAART, E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. **Reprod Fertil Dev.**, v.26, p.12-21, 2014.
- SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.; FILHO, B.D.; PONTES, J.H.; BASSO, A.C.; MEIRINHOS, M.L.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA, M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bos indicus embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v.80, p.372-377, 2013.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p. 1-19, 2011.
- SARGOLZAEI, M.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SCHENKEL, F.; CHESNAIS, J. Genotyping of bovine embryo biopsies with a high density panel for use in genome selection. In: International Plant & Animal Genome Conference, 21st, 2013, San Diego. **Proceedings...** San Diego: PAG, 2013, p. 0541. Disponível em <<https://pag.confex.com/pag/xxi/webprogram/Paper7976.html>>. Acesso em: 24 março de 2015.
- SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. **Theriogenology**, v.51, p.841-854, 1999.
- SHOJAEI SAADI, H.A.; VIGNEAULT, C.; SARGOLZAEI, M.; GAGNÉ, D.; FOURNIER, É.; DE MONTERA, B.; CHESNAIS, J.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. **BMC Genomics**, v.15, p. 889, 2014.
- SUZUKI, T.; SAHA, S.; SUMANTRI, C.; TAKAGI, M.; BOEDIONO, A. The influence of polyvinylpyrrolidone on freezing of bovine IVF blastocysts following biopsy. **Cryobiology**, v.32, p.505-510, 1995.
- THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, v.43, p.71-60, 1995.
- TOMINAGA, K.; IWAKI, F.; HOCHI, S. Conventional freezing of in vitro-produced and biopsied bovine blastocysts in the presence of a low concentration of glycerol and sucrose. **J. Reprod. Dev.**, v.53, p.443-447, 2007.
- VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**. 2006 Jun;12(6):779-96.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Efeito da pré-estimulação ovariana sobre características de oócitos após punção folicular em bovinos. **Arq. Br. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.68-74, 2003.
- VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S. Estatísticas da produção e transferência de embriões em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. **Jornal O Embrião**, 2015.
- XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYÉS, A.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.2510-2518, 2006.

¹Embrapa Gado de Leite, Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG.

²Embrapa, Campo Experimental Santa Mônica (CESM), Distrito de Barão de Juparaná, Valença – RJ.

³Unifenas, Rodovia MG 179, Campus Universitário, Alfenas, MG.

* Autor correspondente- E-mail: luiz.camargo@embrapa.br