

# IDENTIFICACIÓN MEDIANTE RT-AFLP DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL LIGADA AL SEXO EN EMBRIONES BOVINOS EN ESTADIO DE PREIMPLANTACIÓN

**A. GUTIÉRREZ-ADÁN<sup>1</sup>, R. ARROYO-GARCÍA<sup>2</sup>, J.M. MARTÍNEZ-ZAPATER<sup>2</sup>,  
B. PINTADO<sup>1</sup>, J. DE LA FUENTE<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA  
Ctra. de La Coruña Km 5,9, Madrid 28040, España

<sup>2</sup> Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología, INIA,  
Ctra de La Coruña Km 7, Madrid 28040, España

agutierr@inia.es

## RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado si existe expresión génica diferencial entre embriones bovinos producidos *in vitro* de sexo masculino y femenino en estadios tempranos de desarrollo. Se obtuvieron blastocistos bovinos mediante maduración y fecundación *in vitro* y se les realizó una biopsia para analizar su sexo mediante PCR, manteniendo el resto del embrión congelado. Una vez sexados, los embriones fueron agrupados según su género para extraer el RNA. Posteriormente, utilizando las técnicas de RT y AFLP diferencial se aislaron y clonaron seis marcadores genéticos identificativos de RNAm que se expresaban diferencialmente en alguno de los dos géneros, dos de los marcadores identificados eran específicos del sexo masculino y cuatro lo eran del sexo femenino. La comparación de las secuencias entre estos marcadores y los bancos de genes muestran que algunos de estos marcadores son similares a RNAm descritos, pero otros no presentan similitud con ningún RNAm secuenciado. Ésta es la primera evidencia de la presencia de RNAm específicos de embriones bovinos de sexo femenino en estadio de blastocisto.

**PALABRAS CLAVE:** Embrión bovino  
Sexo  
AFLP  
Expresión génica diferencial

## INTRODUCCIÓN

Recientemente se han identificado algunas diferencias biológicas que se manifiestan entre embriones de sexo masculino y femenino en estadios muy tempranos de desarrollo

---

Recibido: 25-4-00

Aceptado para su publicación: 4-8-00

(preimplantación). Una de estas diferencias es la distinta velocidad de desarrollo, que es mayor en los embriones masculinos. Esto explica por qué el sexo de los terneros obtenidos a partir de transferencias de embriones producidos *in vitro* es predominantemente masculino (Hasler *et al.*, 1995; Massip *et al.*, 1996; Behboodi *et al.*, 1997), ya que se suelen transferir los embriones más desarrollados. También se ha descrito una asociación entre sexo y velocidad de desarrollo en embriones de ratón y humanos (Tsunoda *et al.*, 1985; Pergament *et al.*, 1994). Nosotros hemos observado que en algunas condiciones de producción *in vitro* (PIV) los embriones bovinos de sexo masculino no sólo se desarrollan más rápidamente hasta la fase de blastocisto en comparación con los embriones de sexo femenino, sino que una mayor proporción se desarrolla hasta blastocisto expandido (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1993, 1996), produciendo por tanto una mayor proporción de crías de sexo masculino.

Todas estas diferencias entre géneros se producen antes de la diferenciación sexual de las gónadas (3.<sup>a</sup>-4.<sup>a</sup> semanas en vacuno), por lo que ésta no puede ser su causa. Una hipótesis interesante es que estas diferencias de desarrollo son debidas a la expresión de algunos genes presentes en el cromosoma X o en el Y. Por ejemplo, se sabe que el gen SRY del cromosoma Y, implicado en la determinación del sexo en los mamíferos (Koopman, 1995), que se expresa en el anillo urogenital durante la diferenciación embrionaria de los testículos, entre los días 21 a 26 en el vacuno (Daneau *et al.*, 1996), también se transcribe en estadio de preimplantación en ratón (Boyer and Erickson, 1994; Cao *et al.*, 1995), sin embargo en este caso, y al menos en ratón, sufre un procesamiento alternativo que hace que el RNAm tenga forma circular (Capel *et al.*, 1993) en lugar de la forma lineal en que se presenta en el anillo germinal (Jeske *et al.*, 1995). También se han identificado la expresión de este gen en fases tempranas del desarrollo en embriones humanos (Fiddler *et al.*, 1995) y de vacuno (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1997). No es éste el único caso, hasta la fecha se han identificado otros genes que se expresan en estadios embrionarios de preimplantación como el ZFX/ZFY (Zwingman *et al.*, 1993; Bernardi *et al.*, 1996) aunque aún se desconoce su función.

Diferentes estudios han permitido identificar eventos biológicos que están ligados al sexo y que se manifiestan en los embriones de mamífero durante el desarrollo preimplantacional (Fiddler y Pergament, 1997); pero también se desconoce el origen y función de ellos. En este trabajo hemos utilizado la técnica de cDNA-AFLP diferencial para identificar los posibles RNAm que se están expresando de forma diferencial en embriones bovinos de sexo masculino o femenino durante el estadio de blastocisto, que pudieran ser la causa de las diferencias biológicas que se han observado entre sexos en estos estadios embrionarios anteriores a la diferenciación sexual.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Los embriones bovinos obtenidos mediante maduración y fecundación *in vitro* fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto, momento en el que se realizaba una biopsia que era sexada por PCR. Posteriormente se agruparon cinco blastocistos del mismo sexo y se aisló el RNA de tres grupos de cada sexo. A partir de estas muestras se realizó una trans-

cripción inversa (RT) para producir cDNA y se sintetizó la segunda banda de DNA con la DNA polimerasa I. El DNA de doble cadena se utilizó como sustrato para la digestión mediante enzimas de restricción y amplificación selectiva de fragmentos de restricción siguiendo el protocolo de AFLP (Vos *et al.*, 1995). El producto se resolvió en un gel de acrilamida y se aislaron las bandas que estaban presentes únicamente en uno de los dos sexos y que consistentemente aparecían en los tres grupos de embriones analizados. Estas bandas se clonaron y secuenciaron para su posteriormente comparación con las secuencias disponibles en los bancos de datos.

### **Producción *in vitro* de los embriones**

Los métodos de producción *in vitro* (PIV) de embriones vacunos así como de biopsia y sexaje se han descrito previamente en detalle (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1996, 1999).

### **Sexaje y purificación del RNA**

Los blastocistos obtenidos *in vitro* los días 7 y 8 de cultivo (día 1 = primer día de cultivo) fueron recogidos y lavados en PBS conteniendo 0,1 % de PVA y se les realizó una biopsia (aproximadamente de 10 células) para la determinación del sexo mediante la amplificación por PCR de los loci ZFX/ZFY y posterior digestión con el enzima de restricción *HinfI* (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1996). Sólo aquellos blastocistos clasificados morfológicamente como de grado I o II (siguiendo la clasificación estándar de la IETS) fueron incluidos en el experimento. El resto del embrión se congeló directamente en nitrógeno líquido hasta conocer su sexo. Una vez identificado éste, se agruparon los embriones de cada sexo para conseguir tres grupos de cinco machos y tres de cinco hembras. El RNA Poly(A) se aisló siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (QuickPrep Micro RNAm Purification Kit®; Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). El RNA precipitado se disolvió en agua tratada con DEPC, y se digirió con 1 U de RQ DNase I (Promega) a 37 °C durante 20 min para asegurar que la única fuente de DNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fuera el cDNA obtenido del RNA celular. Finalmente, el RNA se purificó con fenol, se precipitó con etanol y una vez resuspendido en 20 µl de agua conteniendo RNAsis se guardó a -70 °C hasta la reacción de RT.

### **Transcripción inversa y producción de la segunda banda de DNA**

La transcripción inversa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante usando el cebador poli(T) para inicio de la síntesis del cDNA (Gibco-BRL, Grand Island, NY) según se ha descrito con anterioridad (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2000). La segunda banda de DNA se produjo utilizando la DNA polimerasa I (Promega) usando las condiciones recomendadas por el fabricante. Una vez terminada la reacción, la doble banda de DNA se precipitó con isopropanol y se resuspendió en 25 µl de H<sub>2</sub>O.

### AFLP diferencial

El cDNA fue digerido utilizando dos enzimas de restricción, *MseI* (New England Biolabs), y *EcoRI* (Pharmacia) (Tabla 1). La digestión se realizó en un volumen de 35  $\mu$ l durante 3 h a 37 °C. Posteriormente se ligaron dos adaptadores distintos, uno al extremo *EcoRI* y otro al extremo *MseI*, diseñados para permitir la reconstrucción de los lugares de restricción, utilizando 1 unidad de T4 DNA ligasa (Boehringer). A continuación, los fragmentos resultantes de la digestión-ligación anterior se diluyeron tres veces para ser utilizados como molde para la primera reacción de amplificación, la denominada preamplificación, previa a la PCR selectiva. La preamplificación consistió en una reacción PCR en la que los cebadores utilizados son complementarios a los adaptadores *EcoRI* y *MseI* y cuentan además con un nucleótido adicional y selectivo en el extremo 3' (Tabla 1). De este modo, sólo se amplifica una fracción (1/16) de los posibles fragmentos de restricción. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l utilizando 5  $\mu$ l de la solución de fragmentos diluida. Se realizaron 13 ciclos de amplificación constituidos por una fase de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, una fase de anclaje de 1 min a 60 °C y una fase de extensión de 1 min a 72 °C.

Posteriormente, los productos de preamplificación fueron utilizados como material de partida para la amplificación radiactiva selectiva. En esta última sólo se marcaron radiactivamente los cebadores *EcoRI*. Para la selección de fragmentos preamplificados (1/128), se utilizaron dos cebadores *EcoRI* y *MseI* que contenían la misma secuencia que los cebadores utilizados para la preamplificación, pero con dos nucleótidos selectivos en el extremo 3' (Tabla 1). La PCR se realizó en un volumen de 20  $\mu$ l y se llevó a cabo empleando los siguientes parámetros: 1 ciclo de 30 seg a 94 °C (desnaturalización), 30 seg a 65 °C (anclaje) y 1 min a 72 °C (extensión) seguido de 12 ciclos en los que la temperatura de anillamiento decrece 0,7 °C por ciclo, seguido por 23 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 56 °C y 1 min a 72 °C. Al finalizar la amplificación selectiva, las muestras se desnaturalizaron por adición de un volumen igual de un tampón de carga con formamida desionizada y colorantes (azul de bromofenol y xilencianol) y calentando durante al menos 3 min a 94 °C. Cinco  $\mu$ l de las muestras se resolvieron en un gel de un 4,5 % de acrilamida:bisacrilamida 19:1, en tampón TBE 1x, durante 3 h a una potencia de 90 W y a una temperatura de 50 °C. El gel se depositó en un papel de cromatografía 3 MM Whatman y se secó usando un secador de geles durante 2 h. Posteriormente, los geles fueron expuestos a una autorradiografía para visualizar los fragmentos de ADN amplificados y separados diferencialmente mediante la electroforesis.

### Purificación y reamplificación de los marcadores diferencialmente expresados

Las bandas de interés se recortaron del papel Whatman en el que se había secado el gel y se rehidrataron con 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, utilizando 2  $\mu$ l directamente para ser reamplificadas mediante PCR. Para ello se utilizaron los mismos cebadores y condiciones de la segunda PCR del AFLP. Estos marcadores amplificados por PCR se clonaron en el vector pGEM TA (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante y se secuenciaron (Servicio de Secuenciación de DNA, CIB-CSIC, Madrid, España). Finalmente se comparó la homología de la secuencia con todas las secuencias publicadas en la base de datos de genes de NCBI (secuencias tag expresadas [ESTs] no redundantes ni repetitivas) utilizando el programa BLASTN 2.0.10 ([www.ncbi.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nih.gov/blast)).

## RESULTADOS

Para optimizar la reacción de AFLP se seleccionó una combinación de cebadores que producía buenos resultados con el cDNA bovino utilizando RNA obtenido de embriones bovinos (Tabla 1). Con estos cebadores analizamos la expresión diferencial en embriones bovinos de distinto sexo. En la Fig. 1 se muestran las bandas que se obtienen después de la electroforesis de los fragmentos obtenidos de la amplificación diferencial y se indican los seis marcadores que se presentaban solamente en uno de los dos sexos. Las bandas de interés recuperadas del gel fueron reamplificadas mediante PCR (Fig. 2) y clonadas. El análisis de sus secuencias se comparó con todas las secuencias publicadas en la base de datos de genes de NCBI (secuencias diana expresada de forma no redundante ni repetitiva). Solamente uno de los marcadores secuenciados coincidía al 95 % con una secuencia de la base de genes (Tabla 2, bovine SRY), por lo que suponemos que el resto de los marcadores clonados corresponden a secuencias no caracterizadas hasta el momento.

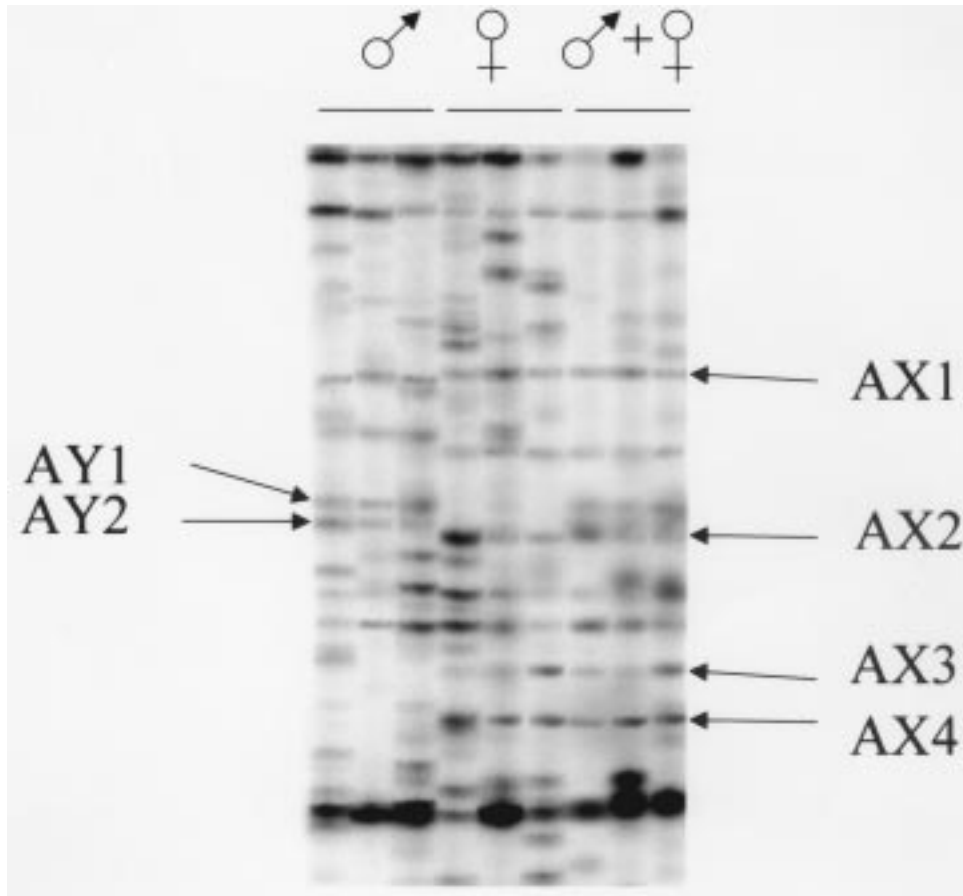
Las dos secuencias presentes únicamente en embriones vacunos de sexo masculino presentaron similitud superior al 35 % con el gen SRY de bovino (AY1) y con un cDNA obtenido de blastocisto de ratón (AY2) de función desconocida. Por otra parte, las cuatro secuencias presentes únicamente en los embriones de sexo femenino presentaron similitud parcial superior al 40 % con un factor de procesamiento del RNA (AX1), con un cDNA bovino de función desconocida (AX2), con el RNAm de la prostraglandina sintetasa de vaca (AX3) y con secuencias del cromosoma X de función desconocida hasta la fecha (AX4).

**TABLA 1**  
**CEBADORES UTILIZADOS EN LOS AFLP**

*Primers used in the AFLP*

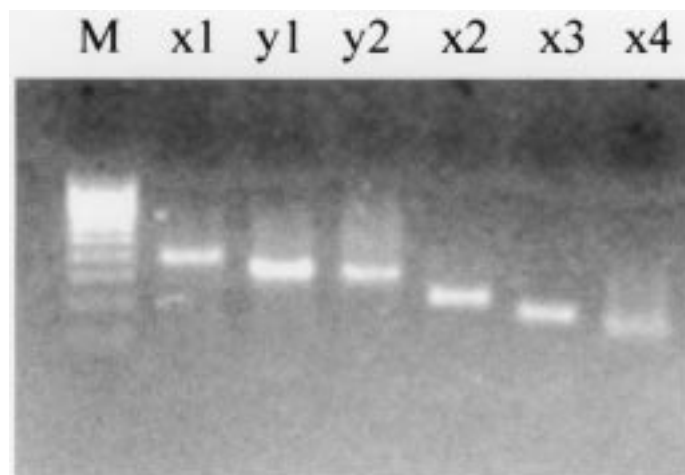
| Nombre                    | Secuencia  |
|---------------------------|--|
| Adaptador <i>EcoRI</i>    | 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'<br>3'-CTGACGCATGGTTAA-5' |
| Adaptador <i>MseI</i>     | 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'<br>3'-TACTCAGGACTCAT-5'   |
| Cebador <i>EcoRI</i> + A  | 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'                          |
| Cebador <i>MseI</i> + C   | 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'                          |
| Cebador <i>MseI</i> + T   | 5'-GATGAGTCCTGAGTAAT-3'                          |
| Cebador <i>EcoRI</i> + AC | 5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'                         |
| Cebador <i>MseI</i> + CT  | 5'-GATGAGTCCTGAGTAACT-3'                         |
| Cebador <i>MseI</i> + TC  | 5'-GATGAGTCCTGAGTAATC-3'                         |

En negrilla se indica el nucleótido selectivo.  
*Selective nucleotide are marked in bold.*



**Fig. 1.**—Bandas electroforéticas obtenidas del cDNA-AFLP diferencial indicando los marcadores obtenidos específicos de cada uno de los sexos de embriones bovinos

*Fig. 1.*—Electrophoretical band obtained from differential cDNA-AFLP indicating the specific marker obtained from embryos of different sex



**Fig. 2.—Reamplificación de los marcadores identificados como específicos de sexo en embriones bovinos en estadio de blastocisto**

*Fig. 2.—Reamplification of markers that have been identified as sex-specific in bovine embryos at the blastocyst stage*

**TABLA 2**

**MARCADORES GENÉTICOS IDENTIFICADOS EN EMBRIONES BOVINOS DE SEXO FEMENINO O MASCULINO, TAMAÑO INDICADO EN PARES DE BASES Y SIMILITUD CON SECUENCIAS GENÉTICAS (GENE BANK)**

*Genetic markers identified in bovine embryos of different sex. Size shown in base pairs. Partial homology with other sequences is presented (Gene Bank)*

| Marcador genético | Tamaño (pb) | Sexo | Similitud parcial con:   |
|-------------------|-------------|------|--|
| AX1               | 310         | X    | Homo sapiens splicing factor Prp8 RNAm   |
| AY1               | 250         | Y    | Knowles Solter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone RNAm sequence                         |
| AY2               | 240         | Y    | Bovine SRY RNAm  |
| AX2               | 220         | X    | MARC 1 BOV Bos taurus cDNA 5' (cDNA identificado de la combinación de cuatro librerías de cDNA)  |
| AX3               | 175         | X    | Bovine lung prostaglandin synthetase (PGF) RNAm<br>Cow prostaglandin F synthetase II (PGFS) RNAm |
| AX4               | 160         | X    | Human Xp26.1-2<br>Human Xp22   |

## DISCUSIÓN

Entre los métodos disponibles para determinar expresión diferencial seleccionamos el denominado cDNA-AFLP diferencial porque presenta grandes ventajas sobre otras técnicas tales como su gran sensibilidad, su capacidad para identificar cDNAs presentes en baja concentración y su repetitividad. Otros métodos alternativos utilizan cebadores aleatorios con bajas temperaturas de anillamiento, tanto para la síntesis del cDNA como para la PCR; por lo que la calidad del producto amplificado es función de la concentración inicial del cDNA y dependiente del porcentaje de homología entre cebador y molde. Por este motivo estos métodos dejan de amplificar cDNA presentes en baja concentración o carentes de homología con los cebadores. El método de cDNA-AFLP que hemos adaptado (Bachem *et al.*, 1996) se basa en la unión de adaptadores al cDNA y la utilización de cebadores específicos a estos adaptadores para la amplificación de los cDNAs. La especificidad de los cebadores permite la utilización de altas temperaturas de anillamiento al inicio de la PCR, lo que favorece una óptima selección de los fragmentos amplificados.

En este trabajo describimos por primera vez la presencia de RNAm específicos de embriones bovinos de sexo masculino o femenino durante el estadio de blastocisto. Anteriormente sólo se habían identificado dos RNAm transcritos a partir de genes presentes en el cromosoma Y y, por lo tanto, específicos del sexo masculino (SRY y ZFY). Nosotros hemos identificado otro marcador específico de embriones de sexo masculino (AY2), aunque desconocemos en qué región cromosómica se localiza. Por otra parte hemos confirmado la presencia de SRY (AY1) en embriones de sexo masculino, aunque se desconoce si este gen, implicado en la determinación de sexo en las células germinales en estadios mucho más avanzados de desarrollo, tiene alguna función en estos estadios previos a la implantación.

Los resultados de este estudio indican también la presencia de RNAs específicos del sexo femenino. Aunque el cromosoma X está presente tanto en los embriones de sexo masculino como en los de sexo femenino, hemos identificado cuatro marcadores que sólo se expresan en los embriones de sexo femenino en el estadio de blastocisto. Solamente uno de estos marcadores (SX4) presenta homología específica con una región del cromosoma X (Tabla 2). Esta expresión específica del sexo femenino podría explicarse como consecuencia del fenómeno de imprinting de algunos genes que estuvieran expresándose en estos estadios tempranos de desarrollo. Algunas funciones de estos genes incluyen por ejemplo: factores de procesamiento del RNA (U2af1), inactivación del cromosoma X (Xist), o factores de desarrollo fetal (Igf2, Igf2r, H19) (Young y Fairburn, 2000).

Es importante destacar la presencia de un RNAm con homología con un factor de procesamiento del RNA. El procesamiento alternativo es un proceso versátil que permite activar o eliminar la expresión de una proteína (por ejemplo, mediante inclusión o eliminación del codón de parada) y permite diversificar tanto estructural como funcionalmente los productos proteicos (incluyendo o eliminando motivos esenciales de una proteína) (Lopez, 1998). Es por lo tanto un sistema que permite aumentar la información contenida en un gen y controlar su expresión. Algunos procesamientos alternativos están regulados como respuesta a cambios producidos en el desarrollo y también a cambios ambientales y suelen estar integrados con otros mecanismos regulatorios de la expresión génica (MacDougall *et al.*, 1995). Un ejemplo de esta estrategia

se ha descrito en *Drosophila*, donde la regulación de la cascada que especifica la identidad sexual y el control del sistema de dosis-compensación, se realizan mediante procesamiento alternativo (MacDougall *et al.*, 1995). La presencia de dos cromosomas X es la señal de identidad de la hembra, acciona muy pronto la expresión del gen *SXL* en el desarrollo; este gen codifica para una proteína de unión al RNA que controla tres decisiones de procesamiento alternativo de otros tantos RNAs, que a su vez son señales de determinación sexual (ver revisión en López, 1998). Desconocemos la función del RNAm similar a un factor de procesamiento que hemos encontrado en los embriones femeninos pero, dada su potencial importancia, estamos realizando librerías de cDNA de embriones masculinos y femeninos con objeto de poder clonar el cDNA completo de estos marcadores específicos de sexo encontrados en estadios tan tempranos de desarrollo y poder así estudiar las funciones de estos RNAs expresados diferencialmente en los embriones de sexo masculino y femenino.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto INIA SC98/100.

### SUMMARY

#### **RT-AFLP-based analysis of sex specific genetic expression of bovine embryos in preimplantation stage**

This research was carried out to study if there is a differential genetic expression between male and female bovine embryos produced *in vitro* during preimplantation stages of development. Bovine blastocysts were obtained by *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture. Biopsies were taken and sex of each embryo was examined by PCR. The remaining embryo was frozen and when sex was determined, several embryos of each sex were grouped and RNA was extracted. Afterwards by means of RT7 and AFLP differential display, six genetic markers were isolated and cloned. Four of these markers were specifically expressed in the female embryos and two were expressed only in the male embryos. Comparing these sequences with the gene bank database showed that meanwhile some of these sequences are homologous to RNAm already described, others don't show any homology with known RNA sequences. Our study is the first report of the presence of specific RNAm in female bovine blastocysts.

**KEY WORDS:** Bovine embryo  
Sex  
AFLP  
Differential genetic expression

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHEM C.W.B., VAN DER HOEVEN R., BRUIJN S.M., VREUGDENHIL D., ZABEAU M., VISSER R.G.F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753.

- BEHBOODI E., GUTIÉRREZ-ADÁN A., ANDERSON G.B., 1997. Inadvertent sex selection in a protocol of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology*, 47, 265 (Abstract).
- BACHEM C.W.B., VAN DER HOEVEN R.S., DE BRUIJN S.M., VREUGDENHIL D., ZABEAU M., VISSER R.G.F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753.
- BOYER T.R., ERICKSON R.P., 1994. Detection of circular and linear transcripts of SRY in pre-implantation mouse embryos: differences in requirement for reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 492-496.
- CAO Q.P., GAUDETTE M.F., ROBINSON D.H., CRAIN W.R., 1995. Expression of the mouse testis-determining gene SRY in male preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 196-204.
- CAPEL B., SWAIN A., NICOLIS S., HACHER A., WALTER M., KOOPMAN P., GOODFELLOW P., LOVEL-BADGE R., 1993. Circular transcripts of the testis-determining gene SRY in adult mouse testis. *Cell* 73, 1019-1030.
- DANEAU I., ETHIER J.-F., LUSSIER J.G., SILVERSIDES D.W., 1996. Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol. Reprod.* 55, 47-55.
- FIDDLER M., ABDEL-RAHMAN B., RAPPOLEE D.A., PERGAMENT E., 1995. Expression of SRY transcripts in preimplantation human embryos. *Am. J. Med. Genet.* 55, 80-84.
- FIDDLER M., PERGAMENT E., 1997. A broader perspective of sexual differentiation. *Am. J. Med. Genet.* 69, 229-231.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., PINTADO B., FUENTES S., PAYAS A., UGARTE C., DE LA FUENTE J., 1993. Influence of micromanipulation and in vitro culture in the sex dependent loss of embryos. Reunion Scientifique de L'Association Européenne de transfert embryonnaire, Nouzilly (France), Abstracts book, p. 206.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., BEHBOODI E., ANDERSON G.B., MEDRANO J.F., MURRAY J.D., 1996. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology* 46, 515-525.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., BEHBOODI E., MURRAY J.D., ANDERSON G.B., 1997. Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 48, 246-250.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., PÉREZ-GARNELO S., GRANADOS J., GARDE J.J., PÉREZ-GUZMÁN M., PINTADO B., DE LA FUENTE J., 1999. Relationship between sex ratio and time of insemination according both time of ovulation and maturational state of oocyte. *Zygote* 7, 37-43.
- GUTIÉRREZ-ADÁN A., OTER M., MARTÍNEZ-MADRID B., PINTADO B., DE LA FUENTE J., 2000. Differential expression of two genes located on the x chromosome between male and female in vitro produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 146-151.
- HASLER J.F., HENDERSON W.B., HURTGEM P.J., JIN Z.Q., MCCAULEY A.D., MOWER S.A., NEELY B., SHUEY L.S., STOKES J.E., TRIMMER S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43, 141-152.
- JESKE Y.W.A., BOWLES J., GREENFIELD A., KOOPMAN P., 1995. Expression of a linear SRY transcript in the mouse genital ridge. *Nature. Genet.*, 10, 480-482.
- KOOPMAN P., 1995. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 713-722.
- LÓPEZ A.J., 1998. Alternative splicing of pre-RNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* 32, 279-305.
- MACDOUGALL C., HARBISON D., BOWNES M., 1995. The developmental consequences of alternative splicing in sex determination and differentiation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 172, 353-76.
- MASSIP A., MERMILLOD P., VAN LANGENDONCKT A., REICHENBACH H.D., LONERGAN P., BERG U., CAROLAN C., DE ROOVER R., BREM G., 1996. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 1-10.
- PEIPPO J., BREDBACKA P., 1995. Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 56-61.
- TSUNODA Y., TOKUNAGA T., SUGIE T., 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow- developing mouse embryos. *Gam. Res.* 12, 301-304.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.* 23, 4407-14.

- YOUNG L.E., FAIRBURN H.R., 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 53, 627-648.
- ZWINGMAN T., ERICKSON R.P., BOYER T., 1993. Transcription of the sex-determining region genes SRY and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 814-817.

