

Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte¹

In vitro production of bovine embryos: the state of the art

Paulo Bayard Dias Gonçalves², Marcos Henrique Barreta, Luciano Ricardo Sandri, Rogério Ferreira, Alfredo Quites Antoniazzi

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

²Correspondências: bayard@biorep.ufsm.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta importante para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e gerar conhecimento nas áreas relacionadas com a oogênese, foliculogênese, fecundação, desenvolvimento embrionário precoce e outras biotécnicas aplicadas a reprodução animal. A maturação nuclear, fecundação e clivagem de oócitos maturados *in vitro* não diferem significativamente daqueles maturados *in vivo*. No entanto, há uma significativa diferença entre esses dois tipos de oócitos no seu potencial de desenvolvimento, resultado de uma maturação citoplasmática e molecular inadequada ou incompleta. A expressão de genes, durante o crescimento e maturação do oócito, com funções essenciais para atingir a fase de ativação do genoma embrionário, pode ser comprometida pela retirada precoce do oócito do folículo e pelas condições de cultivo *in vitro*. Essas são as principais barreiras da produção *in vitro* de embriões. O conhecimento dos fatores envolvidos no processo de maturação fornece subsídios para o aperfeiçoamento de todo o processo e o aumento dos índices de produção. O desenvolvimento folicular e os processos de maturação nuclear, citoplasmática e molecular são concomitantes e inter-relacionados, regulados por vários fatores. Mais especificamente, está sendo abordado nesta revisão o papel da angiotensina II e do fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) no desenvolvimento folicular, maturação de oócito e viabilidade embrionária. A proposta final é realizar uma abordagem atual e específica de cada etapa da técnica e de sua fundamentação fisiológica.

Palavras-chave: maturação de oócito, fecundação *in vitro*, embrião, bovino.

Abstract

The in vitro embryo production (IVP) is an important tool to accelerate the genetic gain in animal production and to perform research related to oogenesis, folliculogenesis, fertilization, early embryonic development and other biotechnologies applied to animal reproduction. The nuclear maturation, fertilization and cleavage obtained from in vitro matured oocytes do not differ significantly of those in vivo matured. However, there is a significant difference among those two oocytes in development potential, which results in inadequate or incomplete oocyte cytoplasmic and molecular maturation. Gene expression can be affected when the oocyte is prematurely removed from the follicle and reinitiates meiosis in a suboptimal in vitro culture conditions. The understanding of the role of the growth factors and hormones involved in the oocyte maturation process will support the development of a new in vitro system of IVP. The process of oocyte nuclear, cytoplasmic and molecular maturation occurs concomitant and interrelated with the follicular development, regulated by several factors. More specifically, the effect of angiotensin II and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on the follicular development, oocyte maturation and embryonic viability was discussed in this review. Also, the article presents the state-of-the-art in each step of the IVP technique and the physiological base.

Keywords: oocyte maturation, *in vitro* fertilization, embryo, bovine.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma importante biotécnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos domésticos de interesse econômico. Essa biotécnica pode ser utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões (TE). A PIV é também uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Devido à sua capacidade de produzir um grande

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 2 de junho de 2007, Curitiba/PR.

número de embriões, a PIV se tornou um instrumento indispensável para outras biotécnicas como a clonagem, a manipulação de genes e a transferência de núcleos.

As diversas vantagens e aplicações dessa biotécnica estão relacionadas à: (1) determinação e controle do sexo dos produtos; (2) aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; (3) rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; (4) estimação do efeito materno sobre a descendência; (5) rápida multiplicação de raças; (6) facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; (7) formação de bancos de gametas congelados; (8) aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e (9) estudo e desenvolvimento de outras biotecnias reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (Gonçalves *et al.*, 2002).

O advento da aspiração folicular *in vivo* ou OPU (*ovum pick up*) e o aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* tornaram viável à aplicação da PIV em escala comercial. Os índices atuais de blastocistos obtidos com a técnica de produção *in vitro* de embriões giram em torno de 20 a 50% (média de 35%). Segundo Gonçalves *et al.* (2002), cada fêmea bovina é capaz de produzir 50 a 100 embriões/ano, com um regime de duas punções semanais por doadora, durante vários meses. Ainda que satisfatórios, esses resultados estão aquém do que a técnica é capaz de fornecer. O aumento da eficiência da PIV está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação *in vitro* de oócitos. Outra limitação da aplicação da PIV é a distância entre o laboratório e as fazendas onde os oócitos são coletados e os embriões transferidos. O desenvolvimento de métodos simples de incubação ou de técnicas eficientes de criopreservação de oócitos e embriões permitirão ampliar o raio de ação do laboratório e com isso difundir ainda mais essa biotécnica.

Etapas da produção *in vitro* de embriões

A técnica de PIV compreende algumas etapas que vão desde a recuperação dos oócitos até o cultivo embrionário *in vitro*. Há mais de uma década, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (Bols *et al.*, 2004). A OPU apresenta uma maior flexibilidade em relação a TE, pois permite a obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade (ainda com resultados inferiores nessa idade), de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou mesmo após o parto. A eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está relacionada à metodologia utilizada, e esta, interfere na quantidade e morfologia dos complexos cumulus oócitos (CCOs), e conseqüentemente na competência para o desenvolvimento embrionário (Bols *et al.*, 1997). A aspiração folicular duas vezes por semana produz uma maior percentagem de embriões grau 1 e um maior número de embriões transferíveis do que aspirações realizadas uma vez por semana (Gibbons *et al.*, 1994). No entanto, a aspiração folicular semanal de animais da raça Nelore pode produzir um bezerro por semana através da PIV (Watanabe *et al.*, 1998), isso demonstra a capacidade da associação OPU/FIV em multiplicar de maneira rápida e eficiente animais geneticamente superiores.

Além da OPU, a obtenção de oócitos a partir de ovários de abatedouro é uma ferramenta de grande valia para pesquisa. Metodologias de recuperação como *slicing* e aspiração folicular com agulha hipodérmica acoplada a uma seringa ou a uma bomba de vácuo proporcionam número suficiente de oócitos com boa morfologia para estudos *in vitro*. Após a recuperação dos oócitos os três processos biológicos subseqüentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

Maturação *in vitro*

Para que o oócito seja capaz de ser fecundado e posteriormente se desenvolver até o estágio de blastocisto, ele precisa ser maturado e, durante essa fase, sofrer diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo. Durante todo o seu desenvolvimento, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação tem início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, a retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear. A maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (MII). Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. *In vitro*, diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testados para a maturação de oócitos, vários meios de maturação, tais como fluido sintético de oviduto (SOF; Gandhi *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 1994a), DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 (Smetanina *et al.*, 2000) e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199), têm sido utilizados. O TCM199 é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, piruvato e antibiótico, entretanto existem variações entre os diferentes protocolos de PIV.

A competência meiótica, ou seja, a habilidade para o reinício da maturação nuclear é obtida quando a concentração e a atividade do pré-MPF (Fator Promotor da fase M) atingem níveis elevados no oócito

(Kobayashi *et al.*, 1991). Em bovinos, isso ocorre no final do desenvolvimento oocitário em folículos com diâmetro de 2 a 3mm (Fair *et al.*, 1995). O MPF é composto por duas subunidades, sendo uma catalítica, constituída pela proteína p34cdc2, e uma reguladora, formada pela proteína ciclina B (Gautier *et al.*, 1990). Em oócitos competentes, durante a fase de VG, o MPF se encontra em sua forma inativa onde a treonina 14 e a tirosina 15 da proteína p34cdc2 estão fosforiladas (Norbury *et al.*, 1991). Existem evidências de que vários eventos durante a maturação de oócitos ocorrem sob a regulação da *mitogen activate protein Kinase* (MAPK; Fissore *et al.*, 1996). Da mesma forma que o MPF, a MAPK também se encontra em uma forma inativa em oócitos no estágio de VG. Durante o reinício da meiose tanto o MPF quanto a MAPK são ativados e os oócitos progridem do estágio de VG para metafase II (MII; Liu e Yang 1999). Os vários fatores que orquestram essa cascata de eventos não estão completamente elucidados. Apesar dos oócitos reiniciarem a meiose após o pico pré-ovulatório de LH, ainda não está comprovado se o LH é o responsável por esse evento na espécie bovina.

Os oócitos adquirem progressivamente a capacidade de completar a maturação nuclear, citoplasmática e suportar o desenvolvimento embrionário até a fase final de crescimento folicular (Eppig 2001; Blondin *et al.*, 2002; Fair, 2003; Lequarre *et al.*, 2005). A maioria dos oócitos coletados para PIV está incluso em pequenos folículos antrais e, apesar de competentes para o reinício da meiose, apresentam baixa capacitação para o desenvolvimento embrionário. *In vivo*, a capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido às alterações moleculares e ultra-estruturais ocorridas no oócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Hyttel *et al.*, 1997). Em suporte a essa idéia, oócitos derivados de folículos grandes são mais capacitados para o desenvolvimento embrionário que oócitos oriundos de folículos pequenos (Lonergan *et al.*, 1994b; Pavlok *et al.*, 1992; Bastos *et al.*, 2005). Entretanto, o tamanho folicular não parece ser único responsável pela total capacitação dos CCOs (Humbolt *et al.*, 2005). Oócitos coletados 6 horas após o pico pré-ovulatório de LH e maturados *in vitro*, apresentam uma elevada taxa de desenvolvimento embrionário (Blondin *et al.*, 2002), muito semelhante à obtida *in vivo*.

Em vários estudos, as condições e os meios usados para maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário têm sido modificados para aumentar a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, as taxas de blastocisto, prenhez e criopreservação obtidas de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são menores que as obtidas pelos sistemas de produção *in vivo* (Greve *et al.*, 1987; Rizos *et al.*, 2002), provavelmente devido a incompleta maturação citoplasmática a qual, reflete na capacidade de desenvolvimento embrionário subsequente.

Nos últimos anos vários grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* e consequentemente melhorar a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares durante o desenvolvimento folicular tais como, fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) já foram testados durante maturação *in vitro* (MIV). A adição de IGF-I ao meio de maturação aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto (Herrler *et al.*, 1992). Já o EGF, quando adicionado ao meio de MIV, acelera o reinício da meiose e altera o padrão de síntese protéica (Lonergan *et al.*, 1996). A sua adição ao meio de maturação juntamente com o IGF-I, melhorou a expansão das células do cúmulus e a maturação nuclear dos oócitos (Lorenzo *et al.*, 1994), mas não afetou o desenvolvimento embrionário (Rieger *et al.*, 1998). Hussein *et al.*, (2006) demonstraram que fatores de crescimento produzidos pelo oócito, como o fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) melhoram a capacitação de oócitos durante a MIV aumentando significativamente o número e a qualidade dos blastocistos obtidos.

Inibidores do reinício da meiose têm sido utilizados com o intuito de aumentar o tempo de maturação citoplasmática *in vitro* e consequentemente melhorar a capacitação dos oócitos durante a MIV. Vários estudos vêm sendo realizados com diferentes grupos de bloqueadores tais como, os inibidores de fosfatases, da síntese protéica, da transcrição e tradução do RNAm. Os inibidores de fosfatases tais como roscovitine e a butirólactona-I impedem a ativação da proteína p34cdc2 e da MAPK e dessa forma não permitem o reinício da meiose (Kubelka *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2000; Mermillod *et al.*, 2000; Nunzia-Ponderato *et al.*, 2002), já a 6-dimetil-aminopurine (6-DMAP) inibe as proteínas kinases serina/treonina (Saeki *et al.*, 1997). Esses produtos inibem de maneira efetiva o reinício da meiose, entretanto não melhoram o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A ciclohexamina, um inibidor da peptidil transferase, impede a síntese de proteínas necessárias ao reinício da meiose e apesar de manter o oócito no estágio de VG não melhora a produção *in vitro* de blastocistos (Lonergan *et al.*, 1998; Saeki *et al.*, 1997). Inibidores da tradução e da transcrição do RNAm tais como, cordycepin e o 5,6-dicloro-1-β-d-ribofuranosilbenzimidazole (DBR) respectivamente, param o início da cascata responsável pelo reinício da meiose (Farin e Yang 1994; Krischek e Meinecke 2002), porém como os demais bloqueadores também apresentam resultados limitados quanto a produção de blastocistos. Apesar dos inibidores supracitados não aumentarem a produção de blastocistos, alguns deles podem ser utilizados como uma alternativa para transportar oócitos de fêmeas que se encontram longe do laboratório sem alterar sua capacidade de desenvolvimento embrionário.

Estudos recentes do nosso laboratório demonstram que a angiotensina II (Ang II) é capaz de reverter o efeito inibitório das células da teca na maturação nuclear de oócitos bovinos (Giometti *et al.*, 2005). Usando células foliculares e os hormônios Ang II e IGF-I, obteve-se um incremento significativo no índice de desenvolvimento embrionário precoce. Os CCOs cultivados em meio de maturação por 12 h na presença de células foliculares e dos respectivos hormônios e permanecendo um período na ausência de células foliculares para completar 24 h de maturação (12 + 12 h) resultaram em maiores índices de clivagem e, especialmente, de blastocistos e eclosão (Stefanello *et al.*, 2006).

Fecundação *in vitro*

Terminada a etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. *In vivo*, os espermatozóide necessitam chegar a ampola do oviduto para fecundar o oócito. Durante esse percurso e, principalmente no ístmo, glicosaminoglicanos induzem a capacitação dos espermatozóides. A capacitação nada mais é que uma desestabilização membrana plasmática, pela remoção de algumas proteínas, sem modificações morfológicas, mas bioquímicas, resultando em uma hiperativação espermática. Esse processo torna possível a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, onde ocorre a reação do acrossomo. *In vitro*, para que esse processo ocorra, os meios usados devem fornecer um ambiente adequado. O meio mais usado para fecundação *in vitro* é o FERT-TALP, que contém em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina. Outros fatores importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio (Iritani e Niwa 1977). O co-cultivo (espermatozóide e oócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os espermatozóides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozóides mortos antes de serem co-cultivados com os oócitos. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o *swim-up*. Após a separação, os espermatozóides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozóides viáveis/ml de meio.

Desenvolvimento embrionário *in vitro*

O momento crítico para o desenvolvimento embrionário inicia logo após a fecundação quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. O embrião, em sua fase inicial de desenvolvimento, é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática (Blondin e Sirard, 1995; Fouladi-Nashta *et al.*, 1998). Essa fase dura até a ativação do genoma embrionário, a qual ocorre, em bovinos, no estágio de 8-16 células e é conhecida como “transição materno-zigótica” (MZT; (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). A transcrição deficiente do genoma embrionário durante essa fase leva ao bloqueio do desenvolvimento em várias espécies. Esse fato foi um dos principais entraves da produção *in vitro* de embriões bovinos nas décadas de 60 e 70, entretanto esta dificuldade contribuiu para o desenvolvimento dos sistemas de cultivo embrionário.

Em alguns laboratórios o co-cultivo de embriões com células somáticas foi utilizado por muitos anos com bons resultados. Entretanto, esse sistema tem sido substituído ao longo do tempo por sistemas mais simples que utilizam meios semi-definidos como CR-1, CR-2, KSOM e SOF associados a uma atmosfera gasosa controlada contendo baixa tensão de oxigênio. Fatores de crescimento como IGF-1, EGF, FGF e TGFβ1 têm sido adicionados ao meio de cultivo *in vitro* com o objetivo de aumentar os índices de desenvolvimento embrionário (Lee e Fukui, 1995; Lonergan *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997). Em meios quimicamente definidos, esses fatores incrementam as taxas de blastocisto, entretanto apresentam resultados limitados em meios que utilizam soro. O tempo de cultivo *in vitro* varia de 7-9 dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia de cultivo *in vitro* sendo que, os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia caso se deseje avaliar a taxa de eclosão *in vitro*.

Considerações finais

Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. Isso porque, o número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões. O aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo *in vitro* permitiram também o avanço de outras biotécnicas tais como a clonagem e a manipulação de genes. No entanto, o gargalo da PIV está na baixa produção e qualidade de embriões, em consequência da deficiência dos processos *in vitro* para uma adequada maturação citoplasmática do oócito, dificultando os processos de preservação dos oócitos e embriões e, conseqüentemente, a implantação em sistemas de produção



animal. Estudos básicos da regulação da maturação de oócito são essenciais para a geração de conhecimentos necessários para o aumento dos índices de produção de embriões *in vitro*.

Referências

- Bastos GM, Gonçalves PBD, Bordignon V.** Development and DNA damage in parthenogenetically activated bovine embryos produced from oocytes derived from small and large follicles. *Biol Reprod*, v.72, p.143, 2005. Abstract.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA.** Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction*, v.66, p.38-43, 2002.
- Blondin P, Sirard MA.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.54-62, 1995.
- Bols PEJ, Leroy JLMR, Vanholder T, Soom AV.** A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, v.62, p.906-914, 2004.
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A.** Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221-1236, 1997.
- Brevini Gandolfi TAL, Gandolfi F.** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2001.
- Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. v.122, p.829-38, 2001.
- Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.
- Fair T, Hyttel P, Greve T.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.437-442, 1995.
- Farin CE, Yang L.** Inhibition of germinal vesicle breakdown in bovine oocytes by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB). *Mol Reprod Dev*, v.37, p.284-292, 1994.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF.** Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.55, p.1261-1270, 1996.
- Fouladi Nashta AA, Waddington D, Campbell KHS.** Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest and Subsequent Development In Vitro: A Comparative Evaluation of Antral Follicle Culture with Other Methods. *Biol Reprod*, v.59, p.255-262, 1998.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL.** A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reprod*, v.15, p.395-401, 2000.
- Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL.** Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*, v.60, p.487-494, 1990.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC.** Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405-419, 1994.
- Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LFS, Carambula SF, Reis AM, de Oliveira JFC, Emanuelli IP, Gonçalves PBD.** Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, v.63, p.1014-1025, 2005.
- Gonçalves, PBD, Figueiredo, JR, Freitas, VJF.** *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. v.1.
- Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P.** In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J Ass Reprod Gen*, v.4, p.281-285, 1987.
- Herzler A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.37, p.1213-1224, 1992.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H.** Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1149-1166, 2005.
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB.** Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*, v.296, p.514-521, 2006.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- Iritani A, Niwa K.** Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil*, v.50, p.119-121, 1977.



- Kobayashi H, Minshull J, Ford C, Golsteyn R, Poon R, Hunt T.** On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol*, v.114, p.755-765, 1991.
- Krischek C, Meinecke B.** In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. *Anim Reprod Sci*, v.73, p.129-140, 2002.
- Kubelka M, Motlik J, Schultz RM, Pavlok A.** Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity. *Biol Reprod*, v.62, p.292-302, 2000.
- Lee ES, Fukui Y.** Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v.44, p.71-83, 1995.
- Liu L, Yang X.** Interplay of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation during Metaphase-to-Interphase Transition of Activated Bovine Oocytes. *Biol Reprod*, v.61, p.1-7, 1999.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Bies-Tran R, Callesen H, Mermillod P.** Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, v.63, p.841-59, 2005.
- Lonergan P, Carolan C, Mermillod P.** Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod Nutr Dev*, v.34, p.329-339, 1994a.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P.** Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod*, v.54, p.1420-1429, 1996.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M.** Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev*, v.57, p.204-209, 2000.
- Lonergan P, Fair T, Khatir H, Cesaroni G, Mermillod P.** Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.50, p.417-431, 1998.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I.** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.48-53, 1994b.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M.** Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Reproduction*, v.101, p.697-701, 1994.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H.** Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology*, v.48, p.605-616, 1997.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal M, Meijer L.** High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.89-95, 2000.
- Norbury C, Blow J, Nurse P.** Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J*, v.10, p.3321-3329, 1991.
- Nunzia Ponderato, Gabriella Crotti, Paola Turini, Roberto Duchi, Cesare Galli, Giovanna Lazzari.** Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. *Mol Reprod Dev*, v.62, p.513-518, 2002.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.63-67, 1992.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F.** The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Reproduction*, v.112, p.123-130, 1998.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.
- Saeki K, Nagao Y, Kishi M, Nagai M.** Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology*, v.48, p.1161-1172, 1997.
- Smetanina IG, Tatarinova LV, Krivokhardchennko AS.** The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Ontogenez*, v.31, p.139-143, 2000.
- Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Gonçalves PB.** Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, v.66, p.2068-2076, 2006.
- Watanabe MR, Lôbo RB, Franceschini PH, Dayan A, Vila RA, Galerani MAV, Watanabe YF.** Embryo in vitro production per session of follicular aspiration in Nelore cows. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.26, p.383-1998.
-