

Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução

Bovine in vitro embryo production: state of art and perspective of a constant evolution technique

Fabiana Cristina Varago¹, Luiza Fernandes Mendonça, Monique de Albuquerque Lagares

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/Reprodução Animal, Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

¹Correspondência: fafavarago@terra.com.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) de mamíferos domésticos de interesse econômico, por meio das técnicas de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), é uma importante biotécnica da reprodução associada ao aumento da produtividade. Na espécie bovina, a técnica de produção *in vitro* de embriões, associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultra-som (*ovum pick up* - OPU), tem sido utilizada como instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal. Nesta espécie, a produção *in vitro* de embriões alcançou um desenvolvimento tecnológico que atualmente permite a sua aplicação em escala comercial, podendo-se obter entre 50 a 100 embriões/fêmea/ano. Considerando que com a transferência de embriões produzidos *in vitro* é possível alcançar uma taxa de prenhez de 50%, podem ser obtidos entre 25 e 50 bezerros/vaca/ano, o que supera a eficiência da metodologia convencional de transferência de embriões (TE), com custos inferiores. No entanto, muitos estudos foram necessários para que esta biotécnica chegasse a este nível, e outras pesquisas ainda devem ser realizadas para transpor as limitações apresentadas pela técnica, aumentando, assim, a viabilidade econômica da produção *in vitro* de embriões. Este trabalho visa descrever a evolução da maturação, fecundação e cultivo *in vitro* ao longo do tempo, bem como as limitações e perspectivas da técnica de PIVE na espécie bovina.

Palavras-chave: embrião, bovino, maturação, fecundação, cultivo

Abstract

In vitro embryo production (IVEP) from economically important domestic mammals through in vitro maturation, fertilization and culture, is an important reproduction biotechnology associated with a productivity increase. In bovines, the in vitro embryo production technique associated with oocyte collection through follicular puncture guided by ultrasound (ovum pick up - OPU) has been used as an important instrument to maximize the exploration of herd reproductive potential by decreasing the interval between generations and accelerating animal genetic improvement. In this specie, in vitro embryo production has reached a technological development level which allows its application in commercial scale, thus, making it possible to obtain around 50 up to 100 embryos/female/year. The transfer of in vitro produced embryos, at lower costs may result in a 50% pregnancy rate or, in other words, 25 up to 50 calves/cow/year, thereby overcoming the efficiency of conventional embryos transfer (ET). However, several studies were necessary until this biotechnology reached this level and further researches must be accomplished in order to overcome the certain limitations, increasing the economical viability of in vitro embryo production. This work aims to describe the evolution of maturation, fecundation and culture in vitro along the years, as well as the limitations and perspectives of the IVEP technique in bovine species.

Keywords: embryo, bovine, maturation, fecundation, culture.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo (Steptoe e Edwards, 1978). Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (Brackett *et al.*, 1982), o que só foi possível graças às pesquisas iniciais desenvolvidas com animais de laboratório.

Atualmente, a produção *in vitro* de embriões compreende três etapas desenvolvidas em laboratório: a maturação oocitária *in vitro*, a fecundação dos oócitos *in vitro* e o cultivo embrionário *in vitro* até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados. No entanto, o desenvolvimento da técnica se deu de maneira progressiva, sendo que os índices de produção embrionária

alcançados atualmente e a realização de todo o procedimento dentro do laboratório (*in vitro*) só foi possível após anos de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e da fisiologia. Como exemplo de pesquisas, há o estudo da função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões, utilização da ultra-sonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos como as prostaglandinas e implantes liberadores de hormônios, desenvolvimento de meios de cultivo entre outros. Hoje, é possível produzir embriões na espécie bovina, sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo-se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados.

Neste sentido, esta revisão tem como objetivo fazer uma análise da evolução da técnica de produção *in vitro* de embriões, bem como abordar os aspectos atuais e as perspectivas desta tecnologia no desenvolvimento da pecuária nacional. O processo de produção *in vitro* de embriões foi alvo de diferentes grupos de pesquisa em diferentes partes do mundo e em épocas distintas, ou seja, a evolução do processo não ocorreu simultaneamente para as suas diferentes etapas.

Maturação *in vitro*

Um dos estudos pioneiros foi realizado por Chang (1955), utilizando oócitos de coelho. Neste estudo, observou-se que a maturação *in vitro* aparentemente não era afetada pela adição de extratos de pituitária ao meio de cultivo, pelo tamanho do folículo e pelo *status* reprodutivo do animal. Os primeiros trabalhos experimentais em embriologia de mamíferos foram realizados com coelhos, tendo em vista características biológicas favoráveis. O tamanho do oócito relativamente grande facilitou a manipulação, e a ovulação induzida pelo acasalamento foi importante para determinação precisa da idade do embrião (Gonsalves *et al.*, 2002).

Na década de 60, Edwards verificou que o desenvolvimento da maturação nuclear dos oócitos, a partir da remoção dos mesmos do ambiente folicular, era um fenômeno comum em várias espécies, incluindo a bovina. Ao cultivar *in vitro* oócitos inclusos em folículos e oócitos livres, foi possível concluir que o fator inibitório da maturação estava presente no folículo, pois este desaparecia com a remoção dos oócitos do ambiente folicular (Edwards 1962, 1965, 1966). Estes trabalhos foram de suma importância, pois estimularam o interesse pelo estudo dos fatores envolvidos na maturação oocitária em meio de cultivo *in vitro*. Neste sentido, os estudos que se desenvolveram no final da década de 60 e na década de 70 objetivaram a determinação das mudanças cronológicas da maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Sreenam, 1968, 1969 citado por Gordon, 1994) e observações da maturação em nível nuclear (Jagiello *et al.*, 1974). No entanto, as primeiras observações quanto às mudanças bioquímicas sofridas pelos oócitos de ruminantes só ocorreram na década de 80 (Crosby *et al.*, 1981; Crosby e Moor, 1984; 1985, citado por Gordon, 1994). No ano de 1988, Kubelba *et al.* verificaram que, no processo de retomada da meiose, ou seja, durante a maturação nuclear, o oócito sofria várias alterações nucleares como a quebra da vesícula germinativa (GVBD), seguida por condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração do núcleo. Foi constatado que, durante a retomada da meiose, o oócito progredia para metáfase I, anáfase I e telófase I, momento no qual ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Nesta ocasião, o desenvolvimento oocitário é bloqueado novamente em metáfase II. A ativação oocitária e a conclusão da meiose só ocorrem no momento da penetração do espermatozóide no oócito, a qual é acompanhada da extrusão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelínico (Gordon, 1994).

A cinética da maturação nuclear de oócitos bovinos foi estudada por Sirard *et al.* (1989). Os tempos transcorridos em cada fase a partir da MIV foram os seguintes: de 10,3 a 15,4 horas em Metáfase I, de 15,4 a 16,6 horas em Anáfase I, de 16,6 a 18 horas em Telófase I e de 18 a 24 horas em Metáfase II. Da mesma forma, Wehrend e Meinecke (2001) encontraram tempos próximos ao descrito. Por esta razão, o tempo de cultivo mais utilizado para maturação *in vitro* é de 24 horas. Alguns trabalhos demonstraram que oócitos bovinos maturados por 18 horas resultaram em taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário semelhantes às observadas em oócitos maturados por 24 horas. O importante é que o tempo de maturação não ultrapasse 24 horas, uma vez que oócitos maturados por 32 horas apresentaram considerável redução no desenvolvimento embrionário após a fecundação *in vitro*, comprovando o efeito prejudicial do envelhecimento oocitário sobre as taxas de produção embrionária (Gordon, 1994).

Além da maturação nuclear, outros processos atuam sobre o oócito de forma a capacitá-lo para expressar seu potencial de desenvolvimento após a fecundação. A aquisição da competência de desenvolvimento do oócito envolve uma série de alterações bioquímicas e estruturais, denominadas em seu conjunto de maturação citoplasmática. Os eventos citoplasmáticos mais estudados compreendem: redistribuição das organelas intracelulares, incluindo a migração das mitocôndrias para a posição perinuclear e deposição dos grânulos corticais abaixo da membrana vitelina, além da maturação dos mecanismos de liberação de Ca^{2+} (Cran, 1989). Os eventos moleculares relacionados à maturação citoplasmática ainda não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que transcritos e proteínas são estocados em uma forma estável durante este período e têm uma importante função durante o desenvolvimento embrionário precoce, quando o genoma do embrião permanece quiescente (Mermillod *et al.*, 2000).

Além da maturação nuclear e citoplasmática, foi constatado que as células foliculares, ou seja, as células da granulosa e do “*cumulus oophorus*” têm um papel importante durante a aquisição da competência

oocitária na maturação *in vitro* (Staigmiller e Moor, 1984). Oócitos com massa de células do cumulus clara e expandida apresentavam maiores taxas de clivagem após a fecundação *in vitro* comparados àqueles sem células do cumulus ou com o cumulus compacto (Sirard e Lambert 1985, 1986; Hyttel *et al.*, 1986).

Somente após a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática é que o oócito se torna competente para permitir o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (Mingoti, 2005).

A grande maioria dos laboratórios tem utilizado o Tissue Culture Medium (TCM) como meio de maturação *in vitro* para oócitos bovinos. Existem poucos relatos sugerindo que outro meio possa ser mais adequado (Gordon, 1994; Gonsalves *et al.*, 2002). Este meio base é modificado de acordo com cada laboratório, sendo geralmente adicionado de piruvato, lactato, aminoácidos, bicarbonato de sódio, vitaminas, entre outras substâncias geralmente nas concentrações encontradas no soro sanguíneo. A suplementação com o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) é de extrema importância, enquanto a suplementação de estrógeno nos meios MIV é opcional de cada laboratório (Gordon, 1994; Gonsalves *et al.*, 2002; Mingoti, 2005, Gonsalves *et al.*, 2007).

A suplementação do meio com fontes protéicas de origem animal tem apresentado os melhores resultados na maturação oocitária e no desenvolvimento dos embriões (Carolan *et al.*, 1995). O Soro Fetal Bovino (SFB) e a Albumina Sérica Bovina (BSA) são as fontes protéicas mais utilizadas. Todavia, meios contendo soro fetal bovino ou albumina sérica bovina não apresentam formulação definida e possuem componentes como fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas que variam significativamente entre diferentes partidas e fornecedores (McKiernan *et al.*, 1992). Isso leva a uma variabilidade do sistema de cultivo e dos resultados, impossibilitando examinar as necessidades nutricionais dos embriões.

Alguns estudos sobre maturação *in vitro* têm avaliado o efeito de diferentes variáveis sobre a aquisição da competência e qualidade de oócitos bovinos. A adição de macromoléculas e suplementos no meio de maturação (Mingoti *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003), a utilização de inibidores da maturação nuclear (Barreto *et al.*, 2003a, b), o efeito de co-cultivo (Ancioto *et al.*, 2004) são exemplos de algumas pesquisas desenvolvidas. Foi observado que a inadequada maturação do oócito reduz as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário, e pode ser decorrente de falha na maturação nuclear e citoplasmática (Castro *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2003a, b; Ancioto *et al.*, 2004, Gonsalves *et al.*, 2007).

Fecundação *in vitro*

Até a década de 40, o conhecimento sobre a fecundação *in vitro* era baseado no estudo de ovócitos de estrelas do mar. Os invertebrados marinhos foram primeiramente utilizados na pesquisa, porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea (Gonsalves *et al.*, 2002). Embora o primeiro estudo relativo à fecundação em mamíferos tenha ocorrido em 1935 (Pincus e Enzmann, 1935), até a década de 50 praticamente nenhum sucesso tinha sido obtido. Austin (1951) e Chang (1951) observaram que, quando os espermatozoides eram depositados no trato reprodutivo da coelha logo após o momento da ovulação, poucos oócitos eram fecundados. Por outro lado, uma proporção muito grande de gametas era fecundada quando a inseminação ocorria na tuba uterina várias horas antes da ovulação (Austin, 1951; Chang, 1951). Foi postulado que os espermatozoides de algumas espécies mamíferas necessitavam de algum tempo no trato reprodutivo feminino antes de adquirir a capacidade de penetrar nos oócitos. Este conjunto de mudanças foi denominado de capacitação espermática.

A capacitação espermática ocorre pela remoção dos fatores decapacitantes presentes no plasma seminal, basicamente proteínas e outras substâncias que recobrem a membrana do espermatozoide. Neste processo, as principais alterações são bioquímicas e constituem-se na remoção do colesterol, a qual eleva a fluidez da membrana espermática (Langlais *et al.*, 1988), entrada de Ca⁺⁺ intracelular (Singh *et al.*, 1978), aumento da concentração de AMPcíclico (White e Aitken, 1989) e alterações de atividades enzimáticas, tal como da proteína quinase C (PKC) envolvida no mecanismo de transdução de sinais que irão desencadear a reação acrossômica (Flormam e First, 1988). Estas alterações bioquímicas promovem uma alteração transitória no padrão de motilidade espermática, denominada hiperativação (Yanagimachi, 1994). Para completar o processo de capacitação, os espermatozoides hiperativados se ligam por meio de receptores da membrana plasmática a proteínas específicas na zona pelúcida do oócito de maneira a induzir a reação acrossômica (Flormam e First, 1988). A reação acrossômica é um processo de exocitose que libera enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e modificam as membranas da região pós-acrossomal, sítio da interação entre oócito e espermatozoide (Sidhu e Guraya, 1989).

Um aumento no interesse na fecundação *in vitro* de oócitos de mamíferos ocorreu após a descoberta da capacitação espermática e, em poucos anos, oócitos de coelha foram fecundados *in vitro* utilizando-se espermatozoides capacitados no útero (Dauzier *et al.*, 1954; Thibault *et al.*, 1954, citados por Bavister, 2002). No entanto, somente após 20 anos é que o processo de fecundação de oócitos de coelha foi repetido, desta vez

utilizando-se espermatozóides capacitados *in vitro* (Ogawa *et al.*, 1972; Brackett e Oliphant, 1975; Hosoi *et al.*, 1981).

Em bovinos, até 1985, poucos relatos de fecundação *in vitro* eram encontrados na literatura, e a maioria dos estudos era realizada na América do Norte, utilizando oócitos maturados *in vivo* (Brackett *et al.*, 1982; Sirard *et al.*, 1986). O nascimento do primeiro bezerro por fecundação *in vitro* ocorreu no dia 9 de junho de 1981. Neste trabalho, foram utilizadas 22 doadoras e sete receptoras e, para a fecundação, foram utilizadas amostras de sêmen fresco e congelado. As amostras de sêmen eram de animais pré-selecionados para inseminação artificial, o que indicava uma boa qualidade seminal. A coleta dos oócitos foi realizada por via cirúrgica e foram recuperados 177 oócitos já maturados dos quais 52% foram fecundados. Embora grande quantidade de embriões tenha sido transferida, a gestação só foi alcançada em uma receptora, a qual havia recebido apenas um embrião no estágio de quatro células. O primeiro bezerro de fecundação *in vitro* nasceu pesando 45 kg e, após alguns meses de observação, não foram constatadas alterações no desenvolvimento e comportamento do animal (Brackett *et al.*, 1982).

O primeiro relato de maturação *in vitro* seguida pela fecundação *in vitro* em bovinos ocorreu no ano de 1977 (Iritani e Niwa) no Japão. No entanto, o nascimento de bezerros após a utilização da maturação *in vitro* seguida de fecundação *in vitro* só foi mencionado em 1986, no trabalho de Hanada *et al.*, que foram os primeiros pesquisadores a utilizarem o cálcio ionóforo para capacitação espermática. Dentre os vários métodos testados para indução da capacitação de espermatozóides bovinos para fins de fecundação *in vitro*, o que se mostrou mais eficiente foi a utilização da heparina, um glicosaminoglicano presente em elevadas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (Gordon, 1994). Acredita-se que a heparina promova a capacitação do espermatozóide ao se ligar e induzir alterações nas proteínas da membrana plasmática, ativando canais iônicos, aumentando o cálcio intracitoplasmático e, conseqüentemente o pH (Bavister, 2002).

Na maioria dos laboratórios, no processo de fecundação *in vitro* em bovinos usa-se sêmen congelado. No entanto, após o descongelamento, é necessário selecionar os espermatozóides vivos e capazes de fecundar. Esta seleção é realizada na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll (Galli e Lazzari, 1996), embora outros sistemas possam ser utilizados como o “swim-up” ou o lavado espermático. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (Gonsalves *et al.*, 2002).

Para maximizar a capacidade fecundante da amostra do sêmen com o mínimo de poliespermia, testes com diferentes concentrações inseminantes devem ser realizados. A partir do resultado obtido, determina-se a concentração de espermatozóides ideal para cada touro. Como a aplicabilidade destes testes em laboratórios comerciais não é muito prática, a concentração geralmente utilizada é a de 2×10^6 espermatozóides/ml, calculada de acordo com a motilidade e a população viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente de Percoll (Gonsalves *et al.*, 2002).

Em relação aos laboratórios, os sistemas de cultivo utilizados para fecundação *in vitro* apresentam muitas diferenças. No entanto, é imprescindível que o meio empregado seja capaz de propiciar ao oócito secundário e ao espermatozóide condições ideais para que a penetração ocorra da forma mais rápida possível (Gordon, 1994). O meio base utilizado na grande maioria dos laboratórios é a formulação Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP) como foi originalmente descrita por Bavister e Yanagimachi (1977) em seus estudos com hamsters. O meio Tyrode-albumina-lactato-piruvato é uma modificação do Tyrode pela adição de 25 mM de bicarbonato de sódio, 0,6% de Albumina Sérica Bovina, além das fontes de energia lactato e piruvato. O pH ótimo para o meio de fecundação é de 7,8 (Gordon, 1994; Mingoti, 2005). O tempo de co-incubação dos oócitos e espermatozóides pode variar de 6 a 24 horas de acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios (Garcia *et al.*, 2005; Mingoti, 2005). A fecundação *in vitro* é um processo dependente de temperatura (Lenz *et al.*, 1983), sendo que os melhores resultados são obtidos quando o processo ocorre em temperatura de 39°C, com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gordon, 1994; Gonsalves *et al.*, 2002; Mingoti, 2005).

Após a fusão do espermatozóide com o oócito, ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pronúcleo masculino. O pronúcleo migra para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem. Conseqüentemente, inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (Yanagimachi, 1994).

Atualmente, o processo de fecundação *in vitro* na espécie bovina é o que apresenta maior sucesso dentre todas as espécies, sendo que 40% ou mais dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até blastocisto, e muitos bezerros já nasceram após a utilização destas técnicas (Hasler, 1998; Bavister, 2002). No entanto, existem diferenças entre as necessidades dos zebuínos (*Bos indicus*) comparadas àquelas de bovinos de origem européia (*Bos taurus*) quanto à fecundação *in vivo* (Oliveira *et al.*, 1994). Neste estudo, foi observada a necessidade de uma dose maior de heparina bem como maior concentração espermática para FIV em zebuínos quando comparada aos taurinos.

Cultivo embrionário *in vitro*

Após o maior entendimento do processo de fecundação em mamíferos, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos. Em 1967, um primeiro trabalho demonstrou que zigotos de rata evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de lactato e piruvato (Whittinham e Biggers, 1967). Um ano depois, Whitten e Biggers obtiveram desenvolvimento de embriões em um meio simples, sem o aporte de substâncias macromoleculares de origem materna (Whitten e Biggers, 1968). No entanto, durante o cultivo, muitos embriões paravam o desenvolvimento entre duas e 16 células dependendo da espécie estudada. Anos mais tarde esta parada foi denominada de bloqueio do desenvolvimento embrionário, que corresponde até hoje a uma resposta embrionária aos efeitos adversos ou carenciais do sistema de produção no momento da transição do genoma materno para o embrionário (Barnes e Eystone, 1990; Petters, 1992). Na espécie bovina, os embriões sofrem bloqueio no estágio de oito células (4º ciclo celular; Smith *et al.*, 1995).

Antes mesmo da descoberta do bloqueio embrionário, Averill *et al.* (1955) reportaram a possibilidade de cultivar embriões ovinos utilizando a transferência de embriões no estágio de duas ou quatro células para o oviduto de coelhas. Em bovinos, este fato só foi reportado anos mais tarde, quando foi comprovado que embriões bovinos em estágio inicial de desenvolvimento poderiam ser cultivados até a fase de blastocisto fora do ambiente uterino de fêmeas bovinas (Sreenan e Scanlon, 1968). No mesmo ano, Adams *et al.* obtiveram resultado similar levando o embrião até o estágio de blastocisto eclodido (Adams *et al.*, 1968 citado por Gordon 1994). Assim como na espécie ovina, estes trabalhos foram realizados utilizando a transferência dos embriões para a tuba uterina de coelhas.

Devido ao sucesso destes trabalhos e à grande dificuldade em transpor o bloqueio sofrido pelos embriões bovinos no estágio de oito células, pesquisadores de todo o mundo passaram a cultivar os embriões utilizando tuba uterina de diferentes espécies animais incluindo camundongos, coelhos, ovelhas e até mesmo ovos de galinha para o cultivo de embriões bovinos (Gordon, 1975; Fehilly *et al.*, 1984; Papaioannou e Ebert, 1986; Blakewood e Zhang, 1993).

A partir destes relatos, foi possível avaliar as propriedades da tuba uterina bem como as necessidades dos embriões no início do desenvolvimento (Gordon, 1994). Entretanto, devido à grande dificuldade e ao tempo despendido para realização do procedimento, métodos alternativos foram desenvolvidos para possibilitar o desenvolvimento embrionário *in vitro*. No final da década de 80, os pesquisadores da área iniciaram o co-cultivo de embriões com células somáticas (Gandolfi e Moor, 1987). As células somáticas mais utilizadas foram as células do oviduto, células da granulosa, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (Buffalo Rat Liver Cells) entre outras (Gordon, 1994; Gonsalves *et al.*, 2002).

No co-cultivo com células somáticas, o meio de cultivo deve ser bastante rico, pois as células somáticas irão competir com os embriões pelos nutrientes. O benefício da adição das células somáticas está na produção de fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal - EGF, fator de crescimento tumoral α - TGF α e fator de crescimento tumoral β 1 - TGF β 1), na remoção de componentes inibitórios do meio de cultivo como radicais livres, metabólitos celulares, amônia e outros (Thompson, 1996; Gonsalves *et al.*, 2002). No entanto, os compostos secretados pelas células apresentam concentração variada e nem sempre é possível identificá-los, podendo ocorrer alteração dos nutrientes presentes no meio, o que impede a avaliação da relação dos componentes e as exigências do embrião (Gordon, 1994; Gonsalves *et al.*, 2002).

Por esta razão, na década de 90, o co-cultivo foi sendo substituído por outros meios de cultivo. Surgiram meios quimicamente definidos simples, como o Hamster Embryo Culture Medium (HECM), ou complexos como o TCM-199 (Tissue Culture Medium). Ambos sem a adição de soro (Pinyopummintr e Bavister, 1991). Dentre os meios testados, os melhores resultados com relação ao desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto ocorreram em meio denominado Synthetic Oviductal Fluid (SOF), desenvolvido por Tervit *et al.* (1972) baseado no fluido do oviduto de ovelhas, posteriormente modificado por Takahashi e First (1992), o qual continua sendo amplamente utilizado.

Os sistemas de cultivo podem ser classificados de acordo com os parâmetros estabelecidos a seguir:

- com ou sem co-cultivo;
- definido ou não definido;
- seqüenciais ou não seqüenciais.

Os meios definidos ou não definidos fazem referência àqueles em que se conhece ou não todos os componentes com os quais são preparados. Segundo Thompson (1996), o ambiente que envolve os embriões em cultivo é determinado pelos mesmos, sendo que o termo definido seria questionável. As pesquisas com utilização de meios definidos e substituição da fonte protéica continuam alvo de interesse desde o início da década de 90 (Pinyopummintr e Bavister, 1991; Keskinetepe e Brackett, 1996). Alguns estudos demonstram a utilização com sucesso de meios de cultura definidos, adicionando o álcool polivinílico (PVA) em substituição à albumina sérica bovina e ao soro fetal bovino, evitando assim, a aderência dos embriões e as substâncias não conhecidas dessas fontes biológicas (Kim *et al.*, 1993; Liu e Foot, 1995). No entanto, embriões cultivados em meio

totalmente definido têm maior chance de sofrerem bloqueio embrionário e redução da viabilidade em relação àqueles cultivados em meio suplementado com albumina sérica bovina ou soro fetal bovino (Takahashi e First, 1992; Keskintepe e Brackett, 1996). Este fato sugere que o desenvolvimento de mórula a blastocisto exige fatores adicionais exógenos que podem ser encontrados no soro fetal bovino e que provavelmente estimulam a diferenciação e a proliferação celular (Lim *et al.*, 1999).

A albumina parece exercer um importante papel na nutrição do embrião em desenvolvimento, especialmente após a compactação. Além disso, embriões produzidos em meio suplementado com álcool polivinílico possuem perfil metabólico alterado quando comparados aos embriões cultivados na presença de albumina ou produzidos “*in vivo*” (Thompson, 2000). A adição de aminoácidos ao meio de cultivo teve impacto positivo na última década, pois possibilitou a redução ou até mesmo a remoção do soro fetal bovino do meio, mantendo aceitáveis taxas de desenvolvimento. Por outro lado, o metabolismo dos aminoácidos e a degradação espontânea destes durante o cultivo (especialmente a glutamina) leva à geração de amônia, prejudicial ao embrião (Thompson, 2000). Infelizmente, até o presente momento não foi estabelecida outra fonte protéica capaz de substituir o soro fetal bovino ou a albumina sérica bovina no cultivo *in vitro* (Mingoti, 2005).

A classificação dos meios de cultivo em seqüenciais e não seqüenciais é um critério adotado nos últimos anos e apoiado pela crescente evidência a respeito das mudanças nos requerimentos e da utilização dos nutrientes pelos embriões no decorrer do desenvolvimento (Gardner e Lane, 1998). Dessa forma, os meios estáticos ou não seqüenciais são aqueles sobre os quais não se efetuam modificações durante todo o período de cultivo. Ao contrário, os meios seqüenciais são aqueles em que a composição vai sendo modificada mediante a adição de substâncias ou troca de todo o meio em função das necessidades ou para eliminar os produtos do metabolismo embrionário, que podem afetar sua viabilidade (Gardner, 1998; Cooke *et al.*, 2002; Lane *et al.*, 2003).

A maioria dos laboratórios tem utilizado o cultivo de embriões em meios semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio (5% de O₂ em comparação aos 20% encontrados no ar atmosférico), sem co-cultivo em células somáticas (Mingoti, 2005). A atmosfera de cultivo, diferentemente daquela usada na maturação e na fecundação *in vitro*, passa a ser 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e umidade saturada a 39°C. Entre os fatores benéficos da baixa tensão de O₂ no meio de cultivo *in vitro* pode-se destacar o aumento do diâmetro embrionário, do número de células da massa celular interna, da transformação de mórula para blastocisto e de blastocisto expandido para eclodido, melhora no aspecto geral do embrião, além da menor espessura da zona pelúcida, o que facilita a eclosão do embrião (Lim *et al.*, 1999).

O cultivo pode se estender até o 7º dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação. Para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros, o cultivo *in vitro* pode se estender até o 8º ou 9º dia após a fecundação *in vitro* (Gonsalves *et al.*, 2002; Mingoti, 2005).

Geralmente, é esperado que, após a maturação *in vitro*, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação atinjam a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido (Bavister *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 2001). Este fato mostra que o cultivo *in vitro* é o principal passo a determinar a eficiência do sistema e que muito deve ser feito para a melhoria dos resultados (Galli *et al.*, 2003).

Limitações da produção *in vitro* de embriões

As taxas de gestação obtidas a partir de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está associada à qualidade do embrião, o que, por sua vez, depende das condições de produção de cada laboratório. Além disso, como na transferência de embriões (TE), o estado reprodutivo e nutricional das receptoras também interfere nos resultados. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado entre 20 e 60% de acordo com cada equipe de trabalho (Garcia *et al.*, 2005).

Outro fator que pode de certa forma limitar o uso da produção *in vitro* de embriões é a distância entre o laboratório e o local onde estão alojadas as receptoras, uma vez que na grande maioria dos casos se realiza a transferência do embrião fresco. Existe uma relação direta entre distância e tempo para a inovação com relação à viabilidade embrionária (Gordon, 1994). O problema relacionado à disponibilidade de receptoras poderia ser amenizado caso os resultados de gestação após a transferência de embriões produzidos *in vitro* criopreservados fossem melhores (Hasler *et al.*, 1995). No entanto, a extrema sensibilidade destes embriões ao processo de criopreservação tem limitado a utilização maximizada desta tecnologia. O método de vitrificação tem apresentado bons resultados como alternativa na criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (Vajta *et al.*, 1999; Werlich *et al.*, 2006). Entretanto, embora utilizado na pesquisa, ainda não tem sido adotado na prática comercial (Garcia *et al.*, 2005).

Outro problema freqüentemente observado é que, uma vez estabelecida a gestação, as perdas durante o primeiro trimestre podem chegar a 10-12% (Galli *et al.*, 2001). Todavia, os maiores problemas parecem ocorrer no momento do parto. Existem vários relatos na literatura de prolongamento de gestação, distocia, aumento da

mortalidade pré-natal e de peso corpóreo. Todas estas alterações fazem parte da “Síndrome da Cria Gigante” (LOS – Large Offspring Syndrome; Young *et al.*, 1998). Existem evidências de que a maioria destes distúrbios está associada ao co-cultivo das células da granulosa ou à alta concentração de soro no meio de cultivo. Em programas comerciais que utilizam condições de cultivo mais controladas e sem a adição de alta concentração de soro, a incidência de LOS tende a diminuir, podendo-se alcançar 95% de gestações normais (Numabe *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2001).

Considerações sobre a técnica de produção *in vitro* de embriões

Qualquer processo de produção, por mais simples que seja, segue uma conduta determinada. Os procedimentos para a produção *in vitro* de embriões já estão relativamente definidos. Os meios de cultivo e os métodos empregados são bastante similares, com algumas variáveis entre os laboratórios. Entretanto, os percentuais de produção de embriões, a qualidade dos mesmos e a capacidade de produzir gestações variam entre equipes e até mesmo entre indivíduos dentro de cada laboratório. Portanto, as diferenças na sensibilidade de cada indivíduo e a dedicação à produção de embriões *in vitro* são fundamentais ao sucesso de um laboratório.

A viabilidade econômica da técnica está intimamente relacionada à eficiência dos laboratórios. Não apenas com relação à taxa de produção dos embriões, mas principalmente com a qualidade do embrião, a capacidade de estabelecer gestação, desenvolvimento fetal e placentário normais, obtenção de gestações a termo e nascimento de crias saudáveis e viáveis. Embora o custo da produção *in vitro* de embriões seja superior ao da transferência de embriões, justifica-se o seu emprego em caso de fêmeas com distúrbios reprodutivos adquiridos que inviabilizem a produção de descendentes. A produção *in vitro* de embriões ainda permite o aumento do potencial de exploração zootécnica de fêmeas de genética superior em um menor período de tempo, uma vez que as sessões de aspiração folicular podem ser realizadas a cada 15 dias. Realizada nesta periodicidade, ou mesmo mensalmente, com índices de produção de 40%, seu rendimento pode superar aquela obtida pela transferência de embriões, e a relação custo/benefício pode se tornar justificável. É importante ressaltar que o objetivo da produção *in vitro* de embriões não é substituir a técnica de transferência de embriões, sendo indicado seu uso em casos de infertilidade adquirida, animais que não respondem mais à superovulação ou nos casos de animais doentes ou recém-mortos.

Perspectivas para a produção *in vitro* de embriões

A necessidade de compreensão exata das exigências metabólicas e fisiológicas do oócito e do espermatozóide, bem como dos embriões em sistemas de cultivo *in vitro* apontam para a realização de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* possam ser fecundados e sustentem o subsequente desenvolvimento do embrião.

O desenvolvimento de uma técnica de criopreservação adequada para a produção *in vitro* de embriões também deve ser alvo dos pesquisadores com o intuito de possibilitar a utilização maximizada da tecnologia de produção embrionária *in vitro*.

Além destes, a biologia molecular deve ser utilizada de modo crescente nos próximos anos de maneira a contribuir com o estudo de genes específicos que possam determinar a fertilidade e a criotolerância dos embriões em programas de reprodução assistida.

Atualmente, o Brasil aparece em posição de destaque com quase 50% do total de embriões produzidos mundialmente. O cenário nacional da produção *in vitro* de embriões deve continuar a crescer nos próximos anos, devido particularmente à pecuária de corte, em especial pela produção de matrizes de raças zebuínas. A produção de embriões em gado de leite deve também apresentar um crescimento, porém mais modesto que o observado nas raças de corte.

Referências

- Ancioto KL, Vantini R, Garcia JM, Mingoti GZ.** Influência das células do *cumulus* e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. *Acta Sci Vet*, v.32, supl., p.114, 2004.
- Austin CR.** Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res*, v.4, p.581-596, 1951.
- Averill RLW, Adams CE, Rowson LEA.** Transfer of mammalian ova between species. *Nature*, v.176, p.167-168, 1955.
- Barnes FL, Eyestone WH.** Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, v.33, p.141-152, 1990.
- Barretto LSS, Castro VSDC, Garcia JM, Mingoti GZ.** Desenvolvimento embrionário a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* com IBMX e roscovitina. *Acta Sci Vet*, v.31, supl., p.240-241, 2003a.
- Barretto LSS, Castro VSDC, Garcia JM, Mingoti GZ.** Efeito de inibidores da maturação nuclear sobre a

- maturação citoplasmática de oócitos bovinos. *Acta Sci Vet*, v.31, supl., p.242-243, 2003b.
- Bavister BD.** Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, v.124, p.181-196, 2002.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T.** Development of *in vitro* mature/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, v.37, p.127-146, 1992.
- Bavister BD, Yanagimachi R.** The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, v.16, p.228-237, 1977.
- Blakewood EG, Zhang L.** The use of chick embryo amniotic fluids for the *in vitro* culture of early stage mammalian embryos. *Theriogenology*, v.39, p.189, 1993.
- Brackett RG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans Dressel MA.** Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v.27, p.147-158, 1982.
- Brackett RG, Olhipant G.** Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, v.12, p.260-274, 1975.
- Carolan C, Lonergan P, Van-Langendonck A, Mermillod, P.** Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, v.43, p.1115-1128, 1995.
- Castro VSDC, Barretto LSS, Garcia JM, Mingoti GZ.** Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos bovinos. *Acta Sci Vet* v.31, supl., p.272-273, 2003.
- Chang MC.** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature*, v.168, p.697-698, 1951.
- Chang MC.** The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *Journal of Experimental Zoology*, v.123, p.379-386, 1955.
- Cooke S, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JPP, Driscoll GL.** Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage specific culture media. *Fertil Steril*, v.78, p.1254-1260, 2002.
- Cran DG.** Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*, n.38, p.49-62, 1989.
- Crosby IM, Osborn JC, Moor RM.** Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. *J Reprod Fertil*, v.62, p.575-582, 1981.
- Edwards RG.** Mammalian eggs in the laboratory. *Sci Am*, v.215, p.72-81, 1966.
- Edwards RG.** Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v.196, p.349-351, 1965.
- Edwards RG.** Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature*, v.196, p.446-450, 1962.
- Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM.** Experimental chimaerism in sheep. *J Reprod Fertil*, v.70, p.347-351, 1984.
- Florman HM, First NL.** The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev Biol*, v.128, p.453-463, 1988.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazari, G.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.
- Galli C, Lazzari G.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *J Reprod Sci*, v.42, p.371-379, 1996.
- Gandolfi F, Moor RM.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil*, v.81, p.23-28, 1987.
- Garcia JM, Avelino KB, Vantini R.** Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, 1, 2005, Londrina, PR. *Biotecnologia da reprodução em bovinos*. Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.
- Gardner DK.** Changes in the requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, v.49, p.83-102, 1998.
- Gardner DK, Lane M.** Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod*, v.13, p.148-159, 1998.
- Gonsalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- Gonsalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo, SP: Varela, 2002. p.195-226.
- Gordon I.** Oocyte recovery and maturation. In: Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.
- Gordon I.** Problems and prospects in cattle embryo transfer. *Ir Vet J*, v.39, p.39-62, 1975.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T.** Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Jpn J Reprod*, v.32, p.208, 1986.
- Hasler JF.** The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *J Anim Sci*, v.76, p.52-74, 1998
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE,**



- Trimmer SA.** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- Hosoi Y, Niwa K, Hatanaka S, Iritani, A.** Fertilization *in vitro* of rabbit eggs by epididimal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Biol Reprod*, v.24, p.637-642, 1981.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T.** Ultrastructural features of preovulatory oocytes maturation in superovulated cows. *J Reprod Fertil*, v.76, p.645-656, 1986.
- 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.
- Jagiello GM, Miller WA, Ducayen MB, Lin JS.** Chiasma frequency and disjunctional behaviour of ewe and cow oocytes matured *in vitro*. *Biol Reprod*, v.10, p.354-363, 1974.
- Keskintepe L, Brackett BG.** *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod*, v.55, p.333-339, 1996.
- Kim J, Niwa K, Lim J, Okuda K.** Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically define, protein-free culture medium. *Biol Reprod*, v.48, p.1320-1325, 1993.
- Kubelba M, Motlik J, Fulka Jr J, Prochazka R, Rimkevichova Z, Fulka J.** Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Res*, v.19, p.423-431, 1988.
- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF.** Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*, v.60, p.407-419, 2003.
- Langlais J, Kan FWK, Granger I, Raymond L, Bleau G, Roberts KD.** Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res*, v.20, p.185-201, 1988.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First LA.** *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent process. *Biol Reprod*, v.29, p.173-179, 1983.
- Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W.** Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Hum Reprod*, v.14, p.458-464, 1999.
- Liu Z, Foote RH.** Development of bovine embryos in Ksom with added superoxid dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod*, v.53, p.786-790, 1995.
- Loneragan P, Rizos D, Ward F, Boland MP.** Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*, v.41, p.427-437, 2001.
- McKiernan SH, Bavister BD.** Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. *In Vitro Cell Dev Biol*, v.28, p.154-156, 1992.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, 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.
- Mingoti GZ.** Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.
- Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AAM.** Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. *Anim Reprod Sci*, v.69, p.175-186, 2002.
- Numabe T, Oikawa,T, Kikuchi T, Horiuchi T.** Birth-weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of *in vitro* or *in vivo* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, v.64, p.13-20, 2000.
- Ogawa S, Satoh K; Hamada M, Hashimoto H.** *In vitro* culture of rabbit ova fertilized by epididymal sperms in chemically defined media. *Nature*, v.238, p.270-271, 1972.
- Oliveira EB, Watanabe YF, Garcia JM.** Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriogenology*, v.41, p.188, 1994.
- Papaioannou VE, Ebert KM.** Developmental of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J Reprod Fertil*, v.76, p.603-608, 1986.
- Petters RM.** Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.415-421, 1992.
- Pincus G, Enzmann E.** The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Med*, v.62, p.665-675, 1935.
- Pinyopommintr T, Bavister BD.** *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized oocytes can develop into morulae/blastocyst in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*, v.45, p.736-742, 1991.
- Shidu KS, Guraya S.** Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol*, v.118, p.231-280, 1989.
- Singh JP, Babcock DF, Lardy HA.** Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J*, v.172, p.549-56, 1978.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL.** Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.40, p.1257-

1263, 1989.

Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec*, v.119, p.167-169, 1986.

Sirard MA, Lambert RD. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol Reprod*, v.33, p.487-494, 1985.

Sirard MA, Lambert RD, Gray P. *In vitro* development of *in vitro* fertilized bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Anim Reprod Sci*, v.12, p.21-29, 1986.

Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *J Exp Zool*, v.273, p.317-326, 1995.

Sreenan JM, Scanlon PF. Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. *Nature*, v.217, p.867, 1968.

Staignmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside of the follicle. *Gamete Res*, v.9, p.221-229, 1984.

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet*, v.2, p.366, 1978.

Takahashi Y, First LN. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, v.37, p.963-978, 1992.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, v.30, p.493-497, 1972.

Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v.45, p.27-40, 1996.

Thompson JG. *In vitro* culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.263-275, 2000.

Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v.52, p.939-948, 1999.

Wehrend A, Meinecke B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.175-184, 2001.

Werlich DE, Barreta MH, Martins LT, Vieira AD, Moraes AN, Mezzalira A. Embriões bovinos PIVE vitrificados em diferentes soluções crioprotetores com ou sem o uso de nitrogênio super resfriado. *Acta Sci Vet*, v.34, p.77-82, 2006.

White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res*, v.22, p.163-77, 1989.

Whitten WK, Biggers JD. Complete development *in vitro* of pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil*, v.17, p.399-401, 1968.

Whittingham DG, Biggers JD. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature*, v.213, p.942, 1967.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (Ed.) *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven, 1994. p.189-317.

Young LE, Sinclair KD, Wilmot I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, v.3, p.155-163, 1998.