



Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos

In vitro embryo production in cattle

Raquel Rodrigues Costa Mello^{1,4}, Joaquim Esquerdo Ferreira¹, Sabrina Luzia Grégio de Sousa²,
Marco Roberto Bourg de Mello¹, Helcimar Barbosa Palhano³

¹Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

²Departamento de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

³Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

⁴Correspondência: raquelmello@ufrj.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica importante para exploração do potencial genético de fêmeas bovinas e tem sido utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo. A PIV envolve as etapas de coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* sendo que a eficiência das etapas de maturação e fecundação *in vitro* não difere daquela obtida *in vivo*. No entanto, o cultivo *in vitro* continua sendo a etapa que apresenta a menor eficiência sendo que, em média, apenas 30% dos oócitos maturados *in vitro* se desenvolvem ao estágio de blastocisto. Adicionalmente, os blastocistos produzidos *in vitro* diferem daqueles produzidos *in vivo*, apresentando menores taxas de prenhez e sendo menos tolerantes à criopreservação. Portanto, o objetivo desta revisão é realizar uma abordagem atualizada das principais etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: bovinos, FIV, OPU.

Abstract

The in vitro embryo production (IVP) is a major tool for exploration of the genetic potential of cows and has been used in commercial scale in Brazil and worldwide. The IVP technique involves the steps of collecting, maturation, fertilization and in vitro culture and the efficiency of the steps of maturation and fertilization in vitro does not differ from that obtained in vivo. However, the in vitro culture continues to be the step that has the lowest efficiency and, on average, only 30% of in vitro matured oocytes develop to blastocyst stage. In addition, in vitro produced blastocysts differ from those produced in vivo, with lower pregnancy rates and are less tolerant to cryopreservation. Therefore, the aim of this review is to perform an updated approach to the main steps of in vitro production of bovine embryos.

Keywords: bovine, IV, F OPU.

Introdução

Nos últimos anos, a produtividade dos rebanhos bovinos tem aumentado significativamente, e isso tem sido atribuído principalmente à intensa seleção de características produtivas através do aperfeiçoamento de biotécnicas de manejo reprodutivo. Desse modo, biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* (PIV) de embriões vêm sendo desenvolvidas a fim de se maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e melhorar os indicadores de produtividade (Buratini Jr., 2006). Dentre as biotécnicas da reprodução, a produção *in vitro* (PIV), associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* - OPU), tem sido utilizada como instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos, pois viabiliza a utilização de animais bastante jovens, diminuindo o intervalo de gerações e permitindo selecionar matrizes potenciais, levando à produção de novilhas de reposição apenas de animais geneticamente superiores, o que contribui para a otimização do melhoramento genético (Varago et al., 2008). Nessa revisão serão apresentados alguns aspectos relacionados à PIV de embriões na espécie bovina.

O principal objetivo da PIV consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético e também aquelas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos na PIV. Outra vantagem está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos, aumentando a vida reprodutiva das doadoras e diminuindo o intervalo de produção dos embriões. Além disso, a biotécnica permite a utilização de touros diferentes para doadoras individuais, assim como viabiliza o emprego do sêmen sexado (Brackett e Zuelke, 1993; Santl et al., 1998; Bueno e Beltran, 2008). Este trabalho de revisão trata de alguns aspectos teóricos e práticos relacionados à PIV de embriões na espécie bovina.

Conceito, Origem e Histórico da Produção *in vitro* de Embriões

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma importante biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (Gonçalves et al., 2008).

Com relação à origem e histórico da PIV, pesquisadores interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram as primeiras pesquisas com a finalidade de estabelecer metodologias e procedimentos que permitissem a manipulação dos embriões. Desse modo, entre 1877 e 1879, foi observada pela primeira vez a fecundação de um oócito de estrela do mar com posterior formação da primeira célula do futuro embrião. Os invertebrados marinhos foram objeto das primeiras pesquisas porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea (Andreotti, 2007; Santos, 2010).

Nos mamíferos, somente no ano de 1929 surgiu o primeiro relato sobre a possibilidade de se cultivar embriões de coelhos desde os primeiros estádios de clivagem até o estágio de blastocisto, sendo que anos mais tarde, em 1959 obteve-se o nascimento do primeiro coelho gerado a partir dessa técnica, sendo originado de oócito fecundado *in vitro*. No final dos anos 70, vários outros relatos da obtenção de PIV seguida de nascimentos de filhotes saudáveis de camundongos e ratos foram registrados. Em 1977 foi relatada a maturação e fecundação *in vitro* de oócito bovino, e em 1978, na Inglaterra, estabeleceu-se um marco na história da PIV no mundo com o nascimento de Louise Brown, o primeiro bebê humano proveniente de um oócito fecundado *in vitro* (Steptoe e Edwards, 1978; Garcia et al., 2004; Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Com relação aos animais de produção, apenas na década de 80 é que surgiram os primeiros relatos sobre MIV e FIV de oócitos bovinos. Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos, o que só foi possível em função das pesquisas iniciais desenvolvidas com animais de laboratório (Brackett et al., 1982). Ainda no final da década de 80, a PIV de embriões bovinos sofreu uma grande expansão, verificando-se que essa técnica poderia ser totalmente realizada sob condições artificiais, onde pôde ser verificado o processo completo de PIV em bovinos, com maturação e fecundação dos oócitos e desenvolvimento embrionário. Nessa mesma década, houve relatos de nascimento a partir de embriões PIV de outras espécies de ruminantes, como ovinos e caprinos (Gonçalves et al., 2008; Varago et al., 2008).

No Brasil, a PIV de embriões bovinos teve início no ano de 1990 após a aprovação de um projeto de inovação tecnológica financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões, localizadas no estado de São Paulo. Desse modo, os primeiros nascimentos a partir de PIV de embriões bovinos foram obtidos em 1994 utilizando oócitos imaturos, sêmen descongelado e sistemas de cultivo. Esta evolução tornou-se possível em função de diversos avanços realizados na definição de condições de cultivo apropriadas, sendo que atualmente, a PIV tem sido utilizada em larga escala comercialmente e por diversos laboratórios no país para pesquisa e multiplicação de material genético na produção animal (Alves et al., 2003; Rumpf, 2007; Bueno e Beltran, 2008; Santos, 2010; Andrade et al., 2012). Em 2011, foi registrada no Brasil a produção de 350.762 embriões bovinos no ano, dos quais 90,7% foram produzidos *in vitro* (Viana, 2012). Nos últimos anos, segundo Viana (2012), tem se observado um crescimento anual na produção de embriões PIV no Brasil e uma queda na produção de embriões produzidos *in vivo* (Fig. 1). É importante ressaltar que em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014). O grande destaque brasileiro na produção *in vitro* de embriões se deve, em grande parte, ao tamanho (aproximadamente 211 milhões de bovinos segundo dados do IBGE em 2013) e as características do rebanho nacional com base, principalmente, em raças zebuínas que apresentam maior produção de oócitos por coleta.

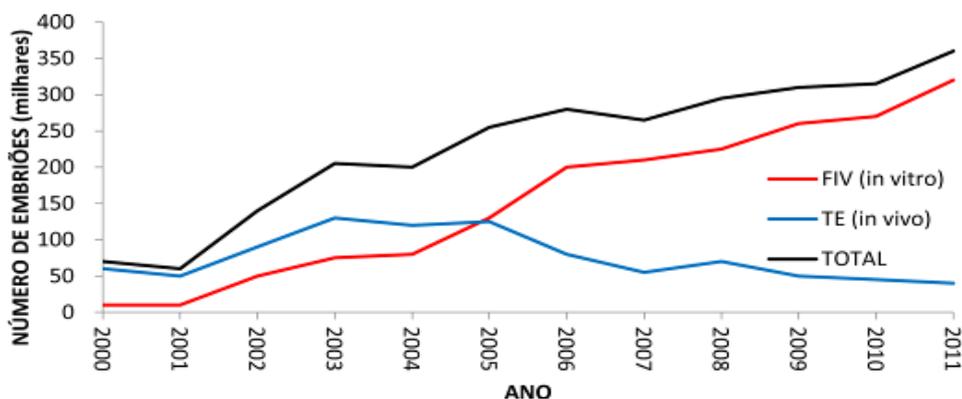


Figura 1. Produção de embriões bovinos no Brasil de 2000 a 2011 (Adaptado de Viana, 2012).

Etapas da Produção *in vitro* de Embriões

A coleta de oócitos para a produção *in vitro* de embriões pode ser feita por diversas técnicas, sendo *post mortem*, a partir da punção folicular quando o número de ovários obtidos de abatedouro é reduzido, ou *in vivo* por meio da laparotomia ou de laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (Varago et al., 2008). Há mais de uma década, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem apresentado uma maior flexibilidade e sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (Bols et al., 2004; Gonçalves et al., 2007; Andrade et al., 2012).

Sabe-se que a eficiência do procedimento de aspiração folicular transvaginal está relacionada à metodologia utilizada, e esta interfere na quantidade e morfologia do complexo *cumulus-oócito* (CCO) recuperado, e conseqüentemente, na competência para o desenvolvimento *in vitro*. Desse modo, tem se observado que a aspiração folicular duas vezes por semana produz maior percentagem de embriões de melhor qualidade e maior número de embriões transferíveis do que as aspirações realizadas semanalmente (Gibbons et al., 1994; Hasler et al., 1995; Looney et al., 1994; Dayan, 2001; Garcia et al., 2004). Após a recuperação dos CCOs, os três processos biológicos subsequentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem as etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (Varago et al., 2008).

A maturação envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que este possa ser fecundado e, posteriormente, possa se desenvolver até o estágio de blastocisto. 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 nuclear ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, o que ocorreria naturalmente com a ovulação, e, *in vitro*, sabe-se que a retirada do oócito do contato com as células foliculares é o fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear. Desse modo, observa-se que a maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio de diplóteno da prófase (meiose I) até a fase de metáfase (meiose II) (Lonergan et al., 1994; Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Existem diversos sistemas de maturação para a PIV de embriões bovinos. Até os dias atuais, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados e testados na maturação dos oócitos *in vitro*, tais como o Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®). Desses sistemas, o TCM199® é o mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (Gandhi et al., 2000; Smetanina et al., 2000). Além do meio, torna-se necessária a presença de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Além da aquisição da maturação nuclear, é necessário que os oócitos adquiram progressivamente, durante a fase final de crescimento folicular, a capacidade de completar a maturação citoplasmática e, dessa forma, possam suportar o desenvolvimento embrionário (Blondin et al., 2002; Lequarre et al., 2005). Nesse contexto, a maturação citoplasmática consiste em diversas modificações ultra-estruturais, moleculares e bioquímicas do citoplasma e da membrana plasmática do oócito, que o permitem adquirir a competência para o desenvolvimento e o mecanismo enzimático relacionado ao bloqueio da polispermia. Observa-se que a maioria dos oócitos coletados para PIV está incluso em pequenos folículos antrais e, desse modo, a capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido às transformações ocorridas no oócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Rizos et al., 2002; Humblot et al., 2005). O bloqueio da retomada da meiose tem sido uma estratégia empregada em vários estudos para permitir uma melhor sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática (Gilchrist e Thompson, 2007). Maziero et al. (2016) avaliaram dois inibidores da meiose (roscovitina e butirolactona) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e concluíram que a associação dos dois proporcionou maiores taxas de clivagem e de blastocisto do que empregados isoladamente. Farghaly et al. (2015) também estudaram o efeito do bloqueio temporário da meiose em oócitos bovinos maturados *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário. Os autores obtiveram maiores taxas de blastocisto nos grupos maturados em meios acrescidos de roscovitina e cilostamida em detrimento do grupo controle (sem inibidores).

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto. Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides, onde se observam modificações bioquímicas, tais como alterações na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando em uma hiperativação espermática. Desse modo, esse processo torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde ocorre a reação acrossômica. Já no processo *in vitro*, para que ocorra todo esse processo, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (Yang et al., 1993; Assumpção et al., 2002;



Gonçalves et al., 2007).

De acordo com alguns autores, o meio mais usado para a fecundação *in vitro* é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que contém agentes capazes de promover a capacitação espermática, como a heparina. Além deste, outros fatores importantes para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio de fecundação. Com relação ao co-cultivo (espermatozoide e oócito), este é realizado por um período que varia de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Para tanto, os espermatozoides vivos são adicionados nas gotas de fecundação contendo os oócitos em uma concentração final que pode variar de 1,0 a 5,0 x 10⁶ espermatozoides viáveis/mL de meio (Iritani e Niwa, 1977; Dayan, 2001).

Após as etapas de maturação e fecundação, e já se tendo formado o zigoto, este deverá passar por inúmeras divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto, estágio adequado para realização da transferência não cirúrgica. No entanto, há um momento crítico para o desenvolvimento embrionário posterior, sendo que este se inicia logo após a fecundação, quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. Este momento crítico ocorre porque o embrião, em sua fase inicial de desenvolvimento, é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática, sendo que essa fase dura até a ativação do genoma embrionário, a qual ocorre, em bovinos, no estágio de 8 a 16 células, e é conhecida como transição materno-zigótica (Blondin e Sirard, 1995; Minami, 1996; Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001; Camargo et al., 2001).

Desse modo, com o passar dos anos, novos sistemas de cultivo foram sendo criados, testados e aperfeiçoados para permitirem o desenvolvimento embrionário *in vitro*, a partir de meios como o Whitten e o Brinster Medium for Ovum Culture (BMOC), e da utilização do co-cultivo de embriões com diversos outros tipos de células, tais como células epiteliais do oviduto bovino (CEOB), células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL (*buffalo rat liver*), células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (Gonçalves et al., 2007; Bueno e Beltran, 2008).

Segundo alguns autores, a contribuição das células somáticas aos sistemas de cultivo está na produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGFβ1, que estimulam a proliferação de células e são importantes para a remoção de componentes inibitórios do ambiente de cultivo, que poderiam ser prejudiciais ao embrião. Entretanto, atualmente, esse sistema tem sido substituído por sistemas mais simples como Charles Rosenkrans (CR-1, CR-2), Synthetic Oviductal Fluid (SOF) e meio simples de potássio otimizado (KSOM) acrescido de aminoácidos e associados a uma atmosfera gasosa controlada contendo 5% de O₂. Observa-se que esses sistemas têm inúmeras vantagens em termos de praticidade e economia, podendo ser utilizados em meios com baixa concentração de soro sanguíneo (Lonergan et al., 1996; Matsui et al., 1997; Camargo et al., 2001; Bueno e Beltran, 2008).

Semelhante aos processos de maturação e fecundação, o cultivo embrionário *in vitro* também requer um ambiente adequado, com tempo, atmosfera e temperatura controlados. Desse modo, o tempo de cultivo *in vitro* tem apresentado variação de 7 a 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. Durante este processo, a taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia de cultivo, sendo que os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia para se avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

O monitoramento da cinética de desenvolvimento embrionário também tem sido uma estratégia interessante para obtenção de avanços na etapa de cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Milazzotto et al. (2016) compararam o perfil de expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro* que foram classificados em duas categorias: embriões apresentando desenvolvimento lento e rápido. Estes autores ainda relacionaram a expressão gênica com o metabolismo energético (piruvato e lactato) dos embriões, sugerindo que diferentes velocidades de clivagem poderiam estar relacionadas com diferentes perfis metabólicos.

Perspectivas Futuras da Produção *in vitro* de Embriões

Embora no Brasil a produção *in vitro* de embriões tenha atingido escala comercial, ainda existem algumas limitações como a baixa taxa de blastocisto que implica no aumento do custo de cada embrião produzido assim como o fato de algumas fêmeas produzirem poucos oócitos e de baixa qualidade (potencial de desenvolvimento). Adicionalmente, os embriões produzidos por esta técnica apresentam baixa resistência à congelamento (criotolerância), devendo ser transferidos a fresco para que se tenha satisfatória taxa de prenhez. Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias para sobrepor estas limitações tem merecido atenção por parte dos pesquisadores. Por exemplo, a adição de agentes antioxidantes (L-ergotioneína ou dimetilglicina) aos meios de cultura promoveu a melhora da qualidade de embriões bovinos (Takahashi et al., 2016; Zullo et al., 2016) assim como maior resistência à criopreservação (Zullo et al., 2016).

A aplicação de técnicas moleculares, como a seleção assistida por marcadores moleculares, para a identificação precocemente de doadoras que irão se destacar pelo número e pela qualidade dos oócitos



produzidos ou de receptoras que apresentem maior fertilidade, poderá reduzir os custos da PIV tornando a técnica ainda mais empregada. Kadarmideen et al. (2015) destacam que a seleção genômica pode ainda ser realizada nos embriões PIV antes da transferência, no entanto os autores ponderam que a obtenção de quantidade adequada de DNA para realização desta técnica seria uma limitação.

A análise de transcriptomas tem sido uma ferramenta cada vez mais empregada na PIV. Labrecque et al. (2016) estudaram transcriptomas de oócitos bovinos oriundos de folículos de diferentes tamanhos correlacionando-os com desenvolvimento embrionário. Bunel et al. (2015) avaliaram o transcriptoma de células do *cumulus oophorus* buscando marcadores moleculares para avaliar a qualidade dos complexos cumulus oophorus (CCOs) de bovinos.

Considerações finais

A produção *in vitro* de embriões apresenta-se bem conceituada quantos aos aspectos relacionados às suas diferentes etapas, sendo que, nos últimos anos, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas quantos aos processos de maturação, fecundação e cultivo. Apesar dos avanços, mais estudos tornam-se necessários para que as etapas mais críticas da PIV, como as etapas de maturação e de cultivo, sejam melhoradas e os índices de prenhez a campo aumentados.

Referências

- Alves DF, Rauber LP, Rubin LF, Bernardi ML, Dezen D, Silva CAM, Rubin MIB. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40, p.279-286, 2003.
- Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Pereira Júnior MV, Oliveira AJ, Nunes DP, Bonato GL, Santos RM. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, p.66-69, 2012.
- Andreotti M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: uso da glutathione durante o processo de lavagem e capacitação espermática. Belém: 2007. 45f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Pará, 2007.
- Assumpção MEOD, Haipeck K, Lima AL, Mello MRB, Oliveira LJ, Oliveira VP, Tavares LMT, Visintin JA. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.39, p.149-156, 2002.
- Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Devel*, v.41, p.54-62, 1995.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.66, p.38-43, 2002.
- 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.
- 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, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.43-64, 1993.
- 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.
- Bueno AP, Beltran MP. Produção *in vitro* de embriões bovinos. *Rev Elet Med Vet*, n.11, p.1-7, 2008.
- Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA. Individual bovine *in vitro* embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology*, v.83, p.228-37, 2015.
- Buratini Jr J. Foliculogênese em bovinos. In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Anais... Londrina: UEL, 2006. p.55-62.
- Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.53, 2001.
- Dayan A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. 2001. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.
- Farghaly T, Khalifa E, Mostafa S, Hussein M, Bedaiwy M, Ahmady A. The effect of temporary meiotic attenuation on the *in vitro* maturation outcome of bovine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.51, p.662-71, 2015.
- 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.
- Garcia JM, Avelino KB, Vantini R.** Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, PR. Anais... SIRAA: Londrina, 2004, p.223-230.
- 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.405419, 1994.
- Gilchrist RB, Thompson JG.** Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v.67, p.6-15, 2007.
- Gonçalves PBD, Barreta MB, 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.
- Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF.** Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauly 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.151-152, 1995.
- 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.
- IETS.** Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 32, p. 14-26, 2014.
- Iritani A, Niwa K.** Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Ferti*, v.50, p.119-121, 1977.
- Kadarmideen HN, Mazzoni G, Watanabe YF, Strobecch L, Baruselli PS, Meirelles FV, Callesen H, Hyttel P, Ferraz JBS, Nogueira MFG.** Genomic selection of *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Anim Reprod*, v.12, p.389-396, 2015.
- Labrecque R, Fournier E, Sirard MA.** Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: Insights from correlation network analysis. *Mol Reprod Dev*, v.83, p.558-69, 2016.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Biestran 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, 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 Devel* v.37, p.48-53, 1994.
- 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*. *Bio Reprod*, v.54, p.1420-1429, 1996.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL.** Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v.41 p.62-72, 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.
- Maziero R, Guaitolini C, Paschoal DM, Kievitsbosch T, Guastali MD, Moraes CN, Landim-Alvarenga FC.** Effect of Temporary Meiotic Attenuation of Oocytes with Butyrolactone I and Roscovitine in Resistance to Bovine Embryos on Vitrification. *Reprod Domest Anim*, v.51, p.204-11, 2016.
- Milazzotto MP, Goëssis MD, Chitwood JL, Annes K, Soares CA, Ispada J, Assumpção ME, Ross PJ.** Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, v.83, p.324-36, 2016.
- Minami N.** Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.361-369, 1996.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Devel*, v.61, p.234-248, 2002.
- Rumpf R.** Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.229-233, 2007.
- Santl B, Wenigerkind H, Schervnthaner W, Mödl J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G, Wolf E.** Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. *Theriogenology*, v.50, p.89-100, 1998.
- Santos KJG.** Efeito da progesterona exógena na produção de embriões em novilhas Gir e Girolando. Goiânia: 2010. 124p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás (UFG), 2010.
- Smetanova 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.
- Stephoe PC, Edwards RG.** Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet*, v.2, p.366, 1978.



Takahashi T, Sasaki K, Somfai T, Nagai T, Manabe N, Edashige K. N. N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. *J Reprod Dev*, v.62, p. 209-12, 2016.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.100-109, 2008.

Viana, JHM. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.

Yang X, Jiang S, Foote RH. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Devel*, v.34, p.94-100, 1993.

Zullo G, Albero G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, v.85, p.668-97, 2016.
