



É possível incrementar o sucesso da PIVE em pequenos ruminantes?

Is it possible to increase IVEP success in small ruminants?

Maiana Silva Chaves¹, José Carlos Ferreira-Silva², Luciana Magalhães Melo³, Antonio Santana dos Santos Filho⁴, Marcos Antonio Lemos de Oliveira², Vicente José de Figueirêdo Freitas¹

¹Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Department of Veterinary Medicine, Ceará State University, Fortaleza-Brazil; ²Laboratory of Reproductive Biotechniques, Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife-Brazil; ³Molecular Genetics Research Unit, University Center Fametro, Fortaleza-Brazil; ⁴ Experimental Station of Arcoverde, Agronomic Institute of Pernambuco, Recife-Brazil

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) permite melhorar rapidamente a genética dos rebanhos, aumentar o conhecimento da fisiologia reprodutiva e servir como ferramenta para outras biotécnicas. Em pequenos ruminantes, a utilização dessa tecnologia ainda é limitada, fato que pode ser justificado tanto pelo reduzido número de profissionais envolvidos em programas de reprodução assistida quanto pela baixa eficiência da PIVE. Diante desse cenário, o propósito dessa revisão é abordar os principais fatores que comprometem a eficiência da PIVE e discorrer sobre alternativas que contribuem para seu aprimoramento.

Palavras-chave: biotécnicas, cabras, oócitos, ovelhas

Abstract

The in vitro embryo production (IVEP) allows to improve the genetics of the herds more rapidly, increase the knowledge of reproductive physiology, and is a tool for other biotechniques. In small ruminants, the use of this technology is still limited, mainly due to the small number of technicians involved with assisted reproduction programs and the low efficiency of the IVEP. Given this scenario, the primary goal of this literature review is to address the main factors that compromise the efficiency of IVEP and discuss alternatives that contribute to its improvement.

Keywords: biotechniques, goats, oocytes, sheep

Introdução

As projeções climáticas indicam uma tendência de aquecimento global com padrões ainda mais variáveis de precipitação pluviométrica (Jacob et al., 2014). Por esse motivo, a criação de espécies com maior capacidade adaptativa às alterações climáticas, como os pequenos ruminantes, torna-se essencial para suprir as futuras demandas do mercado (Luo et al., 2019; Joy et al., 2020).

Os pequenos ruminantes, além de produtores de carne, leite, couro e lã, caracterizam-se pela natureza social, rusticidade, precocidade e prolificidade. Devido a essas características, a população global de caprinos e ovinos continua crescendo, especialmente nas regiões áridas, o que comprova sua tolerância às condições edafoclimáticas e seu importante papel (FAO, 2016).

Diante da importância dos pequenos ruminantes torna-se evidente a necessidade de promover a melhoria genética destes rebanhos. De acordo com Fonseca et al. (2019), Alkan et al. (2021) e Rocha et al. (2021), a disseminação de caprinos e ovinos com alto mérito genético tem sido realizada, principalmente, pela técnica de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE). No entanto, os resultados obtidos com a MOTE ainda sofrem influência do protocolo hormonal utilizado e da resposta individual da fêmea, além de comumente ser constatada a regressão prematura do corpo lúteo (Gibbons et al., 2007; Souza-Fabjan et al., 2017).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é outra ferramenta que também possibilita a melhoria genética do rebanho em tempo reduzido, além das fêmeas não necessitarem de estimulação hormonal exógena para a produção de embriões. Essa biotécnica permite a obtenção de embriões a partir de fêmeas pré-púberes, gestantes, lactantes, senis e de fêmeas que apresentem problemas reprodutivos de caráter adquirido ou até mesmo após o óbito (Anguita et al., 2007; Ashry e Smith, 2015; Baruselli et al., 2018). A

¹Correspondência: maiana.chaves@uece.br

Recebido: 31 de agosto de 2021

Aceito: 23 de novembro de 2021



PIVE consiste das etapas de maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento *in vitro* de embriões, as quais têm contribuído para melhoria do entendimento da fisiologia reprodutiva (Blondin *et al.*, 2012). Apesar dos benefícios advindos da PIVE, sua utilização comercial nos pequenos ruminantes ainda é limitada, sobretudo quando comparada aos bovinos (Candappa e Bartlewski, 2011; Santana *et al.*, 2019). Essa limitação pode ser justificada tanto pelo reduzido número de profissionais envolvidos na indústria da reprodução assistida em pequenos ruminantes (Fonseca *et al.*, 2019).

Ainda em pequenos ruminantes, a eficiência da PIVE é influenciada pela quantidade e qualidade dos oócitos (Paramio e Izquiero, 2016, Souza-Fabjan *et al.*, 2021) As avaliações rotineiramente utilizadas para selecionar oócitos, baseada na quantidade de camadas de células do *cumulus* que os circundam e na homogeneidade do seu ooplasma, além de serem subjetivas, não retratam a sua real capacidade de completar sua maturação, ser fecundado e suportar o desenvolvimento embrionário (Chiamenti *et al.*, 2013, Conceição *et al.*, 2015).

A variação nas taxas de blastocistos observadas nos trabalhos com ovinos (Mara *et al.*, 2013; Naderi *et al.*, 2016; Martín-Maestro *et al.*, 2020) e caprinos (Masudul Hoque *et al.*, 2012; Ferreira-Silva *et al.*, 2021; Souza-Fabjan *et al.*, 2021), refletem os fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem nos resultados. Por esse motivo, essa revisão propõe evidenciar novas técnicas que proporcionam maior compreensão da fisiologia reprodutiva e indicar fatores que contribuem para aumentar a eficiência da PIVE em caprinos e ovinos.

Produção *in vitro* de embriões

Ao possibilitar o aumento da produção de descendentes com alto mérito genético em curto período (Ferreira-Silva *et al.*, 2017), a PIVE é considerada uma ferramenta importante por também auxiliar na compreensão dos eventos fisiológicos associados a competência dos gametas e do desenvolvimento embrionário e no aperfeiçoamento de outras técnicas, como a clonagem e a transgenese (Souza-Fabjan *et al.*, 2021).

Desenvolver *in vitro* fenômenos que ocorrem de forma dinâmica, com constantes modificações no trato reprodutivo da fêmea é um objetivo complexo da PIVE. *In vivo*, oócitos e embriões são expostos a diferentes gradientes de nutrientes, hormônios, citocinas e fatores de crescimento à medida que progredem da tuba uterina até o útero (Wale e Gardner, 2016). Já *in vitro*, essas estruturas são expostas a tipos e concentrações fixas de substâncias, manipulados de forma excessiva, além de estarem expostos a metabólitos. Esse cenário pode resultar em condições subótimas, razão pela qual, a PIVE tem sido responsabilizada por distúrbios funcionais (Del Collado *et al.*, 2017).

No laboratório, os fatores que interferem no metabolismo das estruturas e, por consequência, nos resultados da PIVE, são classificados em químicos e físicos. Nos químicos estão o oxigênio, amônia e as substâncias voláteis, dentre outros e nos físicos, a temperatura, volume do meio por estrutura e o meio de cultivo (Wale e Gardner, 2016). Já no ambiente extra laboratorial, podem ser consideradas as características relacionadas à doadora de oócitos, como idade, nutrição, tratamentos hormonais e estação reprodutiva (Chaves *et al.*, 2013; Santos Junior *et al.*, 2013; Souza-Fabjan *et al.*, 2021).

Aspectos in vitro que interferem na produção in vitro de embriões

Como anteriormente descrito, no laboratório existem uma combinação de variáveis que vão desde a pipetagem até a composição do meio, que induzem estresse e interferem na produção de blastocistos e na saúde da prole a longo prazo decorrente de alterações epigenéticas. Estas variáveis instigam pesquisadores investigarem alternativas para minimizar o estresse (Zhu *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) em condições ideais tem efeito positivo na PIVE por promover competência ao oócitos e embriões a partir de geração de energia (Guemra *et al.*, 2013). No entanto, Wale e Gardner (2016) e Silva *et al.* (2018) descrevem inúmeros fatores que culminam na instabilidade dos resultados da PIVE decorrentes de uma maior produção de ROS. Fatores como manipulação, a luz, tensão de oxigênio, relação embrião-volume de incubação, metabolismo de aminoácidos e produção de amônia, podem gerar bloqueio ou retardo no desenvolvimento dos oócitos, diminuindo sua viabilidade.

Os efeitos nocivos do excesso de radicais livres associado ao estresse oxidativo durante a PIVE é amplamente descrito, razão pela qual faz-se necessário adicionar substâncias com potencial antioxidante (Mukherjee *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016). Ainda quanto ao ambiente de cultivo, Em ovelhas, Natarajan *et al.* (2018) constataram que a suplementação de 50 µM de ácido ascórbico no meio de cultivo de



embriões incubados em atmosfera com 5% de O₂, assim como 100 µM desse ácido adicionado ao meio de cultivo embrionário em atmosfera contendo 20% de O₂ aumentou a quantidade e a qualidade dos blastocistos. Em cabras, Khanday *et al.* (2019) observaram que 100 µM do ácido ascórbico adicionado ao meio de maturação de oócitos incubados na atmosfera de 20% de O₂ foi capaz de melhorar a taxa de maturação. Também em cabras, Veshkini *et al.* (2018) relataram que a adição de 5 mg/mL de geleia real no meio de maturação reduziu a expressão de genes indutores de apoptose e aumentou a concentração de glutatona com melhoria das taxas de clivagem e de blastocistos.

Trabalhos têm apontado que alguns componentes adicionados ao meio de cultivo interferem nos genes que regulam a epigenética (Schwarzer *et al.*, 2012), bem como na expressão de genes *imprinted* (Fernández-Gonzalez *et al.*, 2004), podendo refletir no crescimento fetal, desenvolvimento e função da placenta (Isles e Wilkinson, 2000). Os poucos trabalhos que abordam alterações epigenéticas em embriões ovinos e caprinos produzidos *in vitro* confirmam a influência do meio de cultivo sobre os fatores epigenéticos (Young *et al.*, 2001; Barboni *et al.*, 2011; Feltrin *et al.*, 2017).

Aspectos *in vivo* que interferem na produção *in vitro* de embriões

A qualidade dos oócitos é um dos fatores mais apontados como responsável pelos resultados da PIVE (Aguila *et al.*, 2020), sendo importante conhecer aspectos *in vivo* que influenciam na sua competência. Oócitos oriundos da aspiração folicular por laparoscopia ou de ovários provenientes de matadouros apresentam características intrínsecas que interferem diretamente na quantidade e na qualidade dos embriões produzidos. Quando a aspiração folicular por laparoscopia é realizada após estimulação ovariana, têm sido observadas alterações moleculares, no ambiente folicular e nos complexos *cumulus*-oócito, que podem servir como marcadores para qualidade dos oócitos (Market-Velker *et al.*, 2010).

Em caprinos e ovinos, diversos protocolos de superovulação têm sido propostos com o intuito de melhorar as taxas da produção *in vitro* de embriões. Esses protocolos mostram variações quanto à dose, a fonte e quantidade de aplicações (múltiplas ou one-shot) do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) tipo de progesterona (sintética ou análoga), duração do protocolo, dentre outros (Moraes *et al.*, 2014). Bragança *et al.* (2021), ao avaliarem a influência de progesterona sintética (P₄) e acetato de medroxiprogesterona (MAP), utilizadas em tratamentos superestimulatórios, sobre a qualidade dos oócitos, concluíram que a P₄ exerce influência positiva na expressão dos genes relacionados a via esteroidogênica, desenvolvimento embrionário inicial e marcadores de qualidade, como o zygote arrest 1 (*ZARI*), growth differentiation factor 9 (*GDF9*), B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*), FSH receptor (*FSHr*), LH receptor (*Lhr*) e o estrogênio receptor (*ERα*).

Marcas epigenéticas inadequadas induzem a alterações no padrão de metilações e hidroximetilação do DNA no pronúcleo materno nos zigotos, resultando em modificações na expressão gênica dos blastocistos (Huffman *et al.*, 2015; Ramos-Ibeas *et al.*, 2019). Essas alterações têm sido responsabilizadas por modificações no desenvolvimento fetal (Auwera e D'Hooghe, 2001).

A nutrição é considerada um fator importante na performance reprodutiva de cabras e ovelhas (Gül *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016), tendo em vista que, por meio dos nutrientes e metabólitos, modula a foliculogênese e melhora a taxa de ovulação (Letelier *et al.*, 2008). No entanto, essa melhoria é encontrada apenas quando a suplementação é realizada durante a fase luteal (Scaramuzzi *et al.*, 2010), quando também são identificadas alterações na expressão de genes das células do *cumulus* (Luo *et al.*, 2016).

Além da nutrição, a idade da fêmea exerce influência sobre os resultados da PIVE por acelerar o melhoramento genético do rebanho. Entretanto, a quantidade e a qualidade dos oócitos de fêmeas pré-púberes apresentam alterações que refletem em menores taxas de blastocistos. Inicialmente acreditava-se que a menor competência dos oócitos de ovelhas pré-púberes poderia estar relacionada com anomalias morfológicas e com alterações na atividade fisiológica que comprometiam sua competência (Ledda *et al.*, 2001). Essa hipótese foi posteriormente confirmada ao ser observado que os oócitos dessas fêmeas apresentam alterações quanto a distribuição dos grânulos corticais e das mitocôndrias (Velilla *et al.*, 2004; Velilla *et al.*, 2006), bem como na organização dos microtúbulos e microfilamentos (Velilla *et al.*, 2005). A idade da fêmea também foi relacionada com uma menor atividade do fator promotor da maturação na metáfase II (Choi *et al.*, 2010) e menor síntese de glutatona nos oócitos, induzindo falhas no controle dos radicais livres que comprometem a formação de pronúcleos e blastocistos (Jiao *et al.*, 2013).

Além dos oócitos, os espermatozoides também exercem influência sobre o desenvolvimento do embrião (Verma *et al.*, 2014; Kropp *et al.*, 2017). No momento da fecundação, os espermatozoides



transmitem, além do DNA paterno, RNAs, fatores de transcrição e moléculas de sinalização celular (Krawetz, 2005). Apesar dos touros de alta fertilidade não influenciarem nas taxas de clivagem e de blastocistos, os embriões oriundos desses touros apresentam maior expressão de genes, principalmente daqueles que participam da função mitocondrial e que estão relacionados com atividades catalíticas. Também foi observado que esses embriões apresentam alterações na metilação do DNA (Kropp *et al.*, 2017).

O ambiente em que os oócitos se desenvolvem refletem muito a sua competência (Freitas *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018). Após o recrutamento e à medida que os folículos se desenvolvem, a granulosa e outras células somáticas sintetizam as proteínas necessárias para a maturação do oócito (Da Broi *et al.*, 2018), formando o fluido folicular (Gosden *et al.*, 1988). Além disso, esse fluido contém proteínas de origem extracelular relacionadas com o metabolismo, crescimento e sinalização celular do folículo ovariano (Ambekar *et al.*, 2013). Assim, a heterogeneidade das biomoléculas presentes no fluido folicular indica seu envolvimento nos diversos processos biológicos, sendo responsável por criar um microambiente favorável para o oócito (Freitas *et al.*, 2017). Nesse contexto, é pertinente comentar que o fluido folicular de oócitos fecundados apresentam proteínas que diferem daquelas dos oócitos não fecundados (Iwase *et al.*, 2013, Zachut *et al.*, 2016), bem como apresentam maiores concentrações de compostos antioxidantes (Guo *et al.*, 2018).

Considerações finais

Diante do aumento pela procura por produtos oriundos de pequenos ruminantes a utilização da produção *in vitro* de embriões é essencial para disponibilizá-los em consonância com a sua demanda. Entretanto mesmo com os benefícios advindos dessa biotécnica, ainda existem aspectos relacionados a técnica e aos animais que interferem nos resultados. Essas barreiras têm sido vencidas com o avanço de técnicas adicionais, como as “ômicas”, as quais têm permitido conhecer mais os aspectos fisiológicos envolvidos nas etapas da PIVE, melhorar a produção de embriões e assim disponibilizar alternativas para a obtenção de melhores resultados.

Referências

- Aguila L, et al.** for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals*, v.10, p.2196, 2020.
- Alkan KK, et al.** Multiple ovulation and embryo transfer during the breeding season in Angora goats: A comparison of fresh and vitrified-thawed embryo transfer. *Vet Res Forum*, v.12, p.143-148, 2021.
- Ambekar AS, et al.** Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J proteom*, v.87, p.68-77, 2013.
- Anguita B, et al.** Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, v.67, p.526-536, 2007.
- Ashry M, Smith GW** Application of embryo transfer using *in vitro* produced embryos: intrinsic factors affecting efficiency. *Cattle pract*, v.23, (Pt 1), p.1-8, 2015.
- Auwera VDI, D'Hooghe T.** Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, v. 16, p. 1237-1243, 2001
- Barboni B, et al.** *In vitro* grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. *PLoS One*, p.6, e27550, 2011.
- Baruselli OS, et al.** Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim Reprod*, v.13, p.264-272, 2018.
- Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA.** Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far? *Anim Reprod*, v.9, p.281-289, 2012.
- Bragança GM, et al.** Exogenous progestogens differentially alter gene expression of immature *cumulus*-oocyte complexes in sheep. *Domestic Animal Endocrinol*, v.74, 106518, 2021.
- Candappa IBR, Bartlewski PM.** A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open Reprod. Sci. J*, v.3, p.162-175, 2011.
- Chaves RM, et al.** Influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões da espécie caprina. *Ciênc Anim Bras*, v.14, p.135-142, 2013.
- Chiamenti A, et al.** Use of retinyl acetate, retinoic acid and insulin-like growth factor-I (IGF-I) to enhance goat embryo production. *Acta Vet Hung*, v.61, p.116-124, 2013.



- Choi I, Lee JH, Fisher P, Campbell KH.** Caffeine treatment of ovine cytoplasts regulates gene expression and foetal development of embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.876-887, 2010.
- Conceição JCZ, et al.** Use of retinoids during oocyte maturation diminishes apoptosis in caprine embryos. *Acta Vet Hung*, v.63, p.234-242, 2015.
- Da Broi MG, et al.** Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*, v.35, p.735-751, 2018.
- Del Collado M, et al.** *In vitro* maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. *Reproduction*, v.154, p. 881-893, 2017.
- Dias FCF, et al.** Differential gene expression of granulosa cells after ovarian superstimulation in beef cattle. *Reproduction*, v.146, p.181-191, 2013.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO].** (2016). Statistical Yearbook (Vol. 1). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Feltrin C, et al.** Effects of oocyte source, cell origin, and embryo reconstruction procedures on *in vitro* and *in vivo* embryo survival after goat cloning. *Anim Reprod*, v.14, p.1110-1123, 2017.
- Fernández-Gonzalez R, et al.** Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci*, v.101, p.5880-5885, 2004.
- Ferreira-Silva JC, et al.** Full-term potential of goat *in vitro* produced embryos after different cryopreservation methods. *Cryobiology*, v.75, p.75-79, 2017.
- Freitas C, et al.** Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res*, v.10, p. 1-10, 2017.
- Ferreira-Silva JC, et al.** Evaluation of quality and gene expression of goat embryos produced *in vivo* and *in vitro* after cryopreservation. *Cryobiology*, v.1010, p.115-124, 2021.
- Fonseca JF, et al.** Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. *Reprod Fertil Dev*, v.31, p.17-26, 2019.
- Gibbons A, et al.** Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.423-426, 2007.
- Gosden RG, et al.** Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Reproduction*, v.82, p.813-825, 1988.
- Guemra S, et al.** *In vitro* maturation of bovine oocytes in medium supplemented with quercetin, and its effect on embryonic development. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.65, p.1616-1624, 2013.
- Guo X, et al.** Metabolic effects of FecB gene on follicular fluid and ovarian vein serum in sheep (*Ovis aries*). *Int J Mol Sci*, v.19, p.539, 2018.
- Gül S, Keskin M, Göçmez Z, Gündüz Z.** Effects of supplemental feeding on performance of Kilis goats kept on pasture condition. *Ital J Anim Sci*, v.15, p.110-115, 2016.
- Huffman SR, Pak Y, Rivera RM.** Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Mol Reprod Dev*, v.82, p.207-217, 2015.
- Isles AR, Wilkinson LS.** Imprinted genes, cognition and behaviour. *Trends Cogn Sci*, v.4, p.309-318, 2000.
- Iwase A, et al.** A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between fertilized oocytes and non-fertilized oocytes in the same patient. *J Assist Reprod Genet*, v.30, p. 1231-1238, 2013.
- Jacob D, et al.** EURO-CORDEX: new high-resolution climate change projections for European impact research. *Reg Environ Change*, v.14, p.563-578, 2014.
- Jiao GZ, et al.** Developmental potential of prepubertal mouse oocytes is compromised due mainly to their impaired synthesis of glutathione. *PLoS one*, p.8, e58018, 2013.
- Joy A, et al.** Resilience of small ruminants to climate change and increased environmental temperature: A Review. *Animals*, v.10, n.5, p.867, 2020.
- Khanday SB, et al.** Effect of antioxidant ascorbic acid on *in vitro* maturation of Caprine oocytes under normal and elevated temperatures. *Indian J Anim Res*, v.53, p.1020-1024, 2019.
- Krawetz SA.** Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, v.6, p.633-42, 2005
- Kropp J, et al.** Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC genomics*, v. 18, p. 1-15, 2017.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S.** Cell coupling and maturation-promoting factor activity in *in vitro*-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol Reprod*, v.65, p.247-252, 2001.



- Letelier C, et al.** Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction*, v. 136, p. 65-72, 2008.
- Luo F, et al.** Analysis of genes that influence sheep follicular development by different nutrition levels during the luteal phase using expression profiling. *Anim Genet*, v.47, p.354-364, 2016.
- Luo J, Wang W, Sun S.** Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australas J Anim Sci*, v.32, p.1284, 2019.
- Mani S, et al.** Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. *Epigenetics*, v.15, p.12-25, 2020.
- Mara L, et al.** Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season. *Zygote*, v.22, p.366-371, 2013.
- Market-Velker BA, et al.** Dual effects of superovulation: Loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet*, v.19, p.36-51, 2010
- Martín-Maestro A, et al.** Cellular and Molecular Events that Occur in the Oocyte during Prolonged Ovarian Storage in Sheep. *Animals*, v.10, p.2414, 2020.
- Masudul Hoque SA, et al.** Effect of Goat Follicular Fluid on *in vitro* Production of Embryos in Black Bengal Goats. *Iran J Appl Anim Sci*, v.2, p. 287-294, 2012.
- Moraes JCF, Souza CJH, Gonçalves PBD, Freitas VJF, Lopes Júnior ES. In: Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Roca, p.31-69, 2014.
- Mukherjee A, et al.** Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet*, v.31, p.229-239, 2014.
- Naderi MM, et al.** The Effect of Media Supplementation with Angiotensin on Developmental Competence of Ovine Embryos Derived from Vitrified-warmed Oocytes. *Avicenna J Med Biotechnol*, v. 8, p.139-144, 2016.
- Natarajan R, Bhawani SM, Munuswamy D.** Effect of L-ascorbic acid supplementation at different gaseous environments on *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Anim Reprod*, v.7, p.21-28, 2018.
- Paramio MT, Izquierdo D.** Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, v.86, p.152-159, 2016.
- Ramos-Ibeas P, et al.** Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev*, v.86, p.1292-1306, 2019.
- Rocha MS, et al.** Custo e eficiência da técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos ao longo de quatro anos: Influência da capacitação do médico-veterinário. *Res., Soc. Dev*, v.10, p. e43910918312-e43910918312, 2021.
- Santana PDPB, et al.** Contributions of RNA-seq to improve *in vitro* embryo production (IVP). *Anim Reprod*, v.16, p.249-259, 2019.
- Santos Junior ER, et al.** Avaliação de embriões ovinos provenientes de oócitos submetidos a estresse calórico durante a maturação *in vitro*. *Cienc Anim Bras*, v.14, p.360-365, 2013.
- Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J.** Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.32-41, 2010.
- Schwarzer C, et al.** ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum Reprod*, v.27, p.2627-40, 2012.
- Silva PGC, et al.** Temporal expression of pluripotency-associated transcription factors in sheep and cattle preimplantation embryos. *Zygote*, v.26, p.270-278, 2018.
- Souza-Fabjan JMG, et al.** Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. *Theriogenology*, v.103, p.24-29, 2017.
- Souza-Fabjan JM, et al.** *In vitro* production of small ruminant embryos: Latest improvements and further research. *Reprod Fertil Dev*, v.33, p.31-54, 2021.
- Sugimura S, et al.** Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. *Sci Rep*, v.7, p.1-14, 2017.
- Velilla E, et al.** Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol Reprod Dev: Incorpor Gam Res*, v.68, p.507-514, 2004.
- Velilla E, Rodríguez-Gonzalez E, Vidal F, Paramio MT.** Microtubule and microfilament organization in immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*, v.13, p.155-165,



2005.

Velilla E, et al. Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev: Incorpor Gam Res*, v.73, p.617-626, 2006.

Verma, A., et al. Genome-wide profiling of sperm DNA methylation in relation to buffalo (*Bubalus bubalis*) bull fertility. *Theriogenology*, v.82, p.750-759, 2014.

Veshkini A, et al. Oocyte maturation with royal jelly increases embryo development and reduces apoptosis in goats. *Anim Reprod*, v.15, p.124, 2018.

Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod update*, v.22, p.2-22, 2016

Young LE, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*, v.27, p.153-154, 2001.

Zachut M, Sood P, Levin Y, Moallem U. Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. *J Proteom*, v.139, p.122-129, 2016.

Zhou Z, et al. Using cysteine/cystine to overcome oxidative stress in goat oocytes and embryos cultured *in vitro*. *Mol Med Rep*, v.14, p.1219-1226, 2016.

Zhu J, et al. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *Int J Vet Sci Med*, v.6, p.15-26, 2018.
