



Produção *in vitro* de Embriões na Espécie Bovina

Fotos cedidas pelos autores

Uma promissora ferramenta de multiplicação animal

Introdução

A inseminação artificial (IA) em bovinos foi o primeiro passo para acelerar a transferência de características desejáveis e permitindo a disseminação de genes de machos considerados superiores e a

de reprodução assistida em animais, ocorreu um grande avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção.

A transferência de embriões (TE) proporciona um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, podendo aumentar, em média, 10 vezes o número de crias por ano. Com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV) esse potencial de multiplicação se torna ainda maior. A aspiração de ovócitos diretamente dos folículos ovarianos, associada à maturação e fecundação *in vitro* desses, e ao cultivo *in vitro* dos embriões, permite que sejam produzidas, em média, 36 crias por ano oriundos de uma única fêmea. Além disso, somente com o estabelecimento da PIV de embriões é que técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a transgenia podem ser aprimoradas e utilizadas (Rumpf et al., 2000).

Embriões produzidos *in vitro* são aqueles produzidos pela manipulação de gametas, fora de organismo materno. Essa técnica, inicialmente, se resumia à fecundação *in vitro* (FIV); entretanto, após o nascimento do primeiro bezerro, em 1981, (Brackett et al., 1982), foram obtidos avanços consideráveis. Atualmente, essa tecnologia se refere à combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção dos ovócitos imaturos à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo. Essa biotécnica surge como uma nova opção para a multipli-

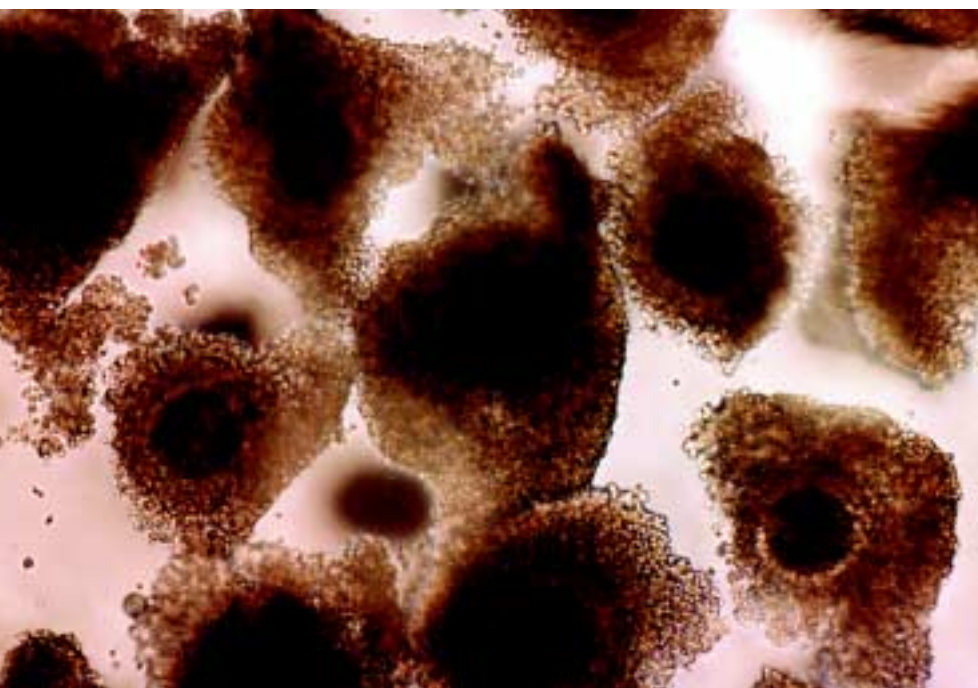


Figura 1 - Ovócitos bovinos imaturos, logo após a aspiração dos folículos ovarianos, apresentando células do cumulus compactas

Margot Alves Nunes Dode
Médica Veterinária, PhD - Pesquisadora
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Rodolfo Rumpf
Médico Veterinário, PhD - Pesquisador
Embrapa - Recursos Genéticos e
Biotecnologia

melhoria do nível zootécnico dos rebanhos. Um reprodutor bovino pode produzir milhares de bezerros durante sua vida produtiva pela IA, enquanto, no mesmo período, uma fêmea não é capaz de produzir mais do que de 8 a 10 bezerros. Portanto, o possível ganho genético obtido pela linhagem materna era extremamente limitado. Com o desenvolvimento de técnicas

cação animal, não só pelo seu potencial, mas também porque abre a possibilidade de utilizar bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

Obtenção de ovócitos imaturos para PIV

O desenvolvimento do método de punção folicular transvaginal (OPU) tem possibilitado a recuperação de ovócitos de animais vivos, permitindo a produção de embriões de fêmeas de várias idades e diferentes estágios fisiológicos.

Na OPU a obtenção de ovócitos é feita pela punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de forma que os folículos a serem puncionados são visualizados na tela do ultra-som. A média de ovócitos viáveis obtidos por coleta *in vivo* é em torno de oito, entretanto essa média depende da estratégia adotada. Assim, é possível puncionar os folículos de uma doadora duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, sendo que, nas duas últimas alternativas, é possível dobrar os resultados mediante a estimulação hormonal (Goodhand et al., 1999). Independente da estratégia, o resultado final esperado é de, pelo menos, uma gestação por semana por doadora (Peixer, et al., 1996; Bousquet, et al., 2000).

Ovários de abatedouro são a principal fonte de ovócitos para serem utilizados na pesquisa, e são geralmente provenientes de animais sem valor econômico. A aspiração de ovócitos a partir desses ovários, da mesma forma que no método *in vivo*, é realizada com uma agulha acoplada a uma bomba à vácuo, com a qual se aspiram todos os folículos presentes na superfície dos ovários com diâmetro variando entre 2 e 6 mm. A média de ovócitos recuperados por ovário está entre 6 e 10, sendo que a quantidade e a qualidade dos ovócitos obtidos é influenciada pela época do ano, estado fisiológico do animal e tamanho do

folículo aspirado (Dode et al., 2001). Convém ressaltar, entretanto, que, quando se trabalha com ovários isolados de vacas de elevado mérito genético, além da punção dos folículos visíveis, pode ser feita a dissecação desses ovários, maximizando o seu aproveitamento.

Maturação *in vitro* de ovócitos

Durante a ovogênese, os ovócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. A

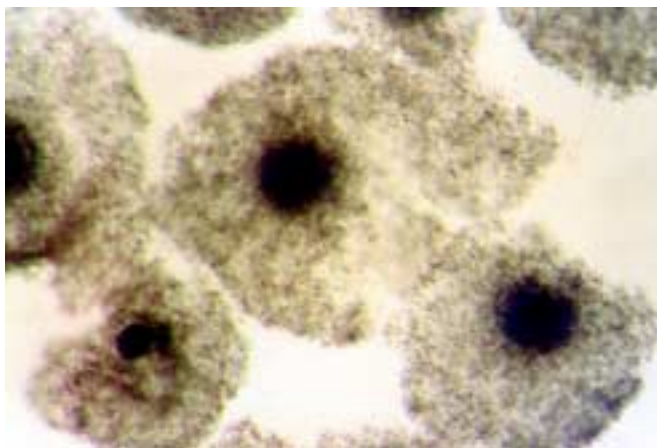


Figura 2 - Ovócitos bovinos maduros, após 22 horas de maturação *in vitro*, apresentando expansão das células do cumulus

retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, ou pela retirada do ovócito de dentro do folículo (Warssaman & Albertini, 1994). Portanto, quando os ovócitos são aspirados dos folículos ovarianos (normalmente entre 2- 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro* (MIV). Essa é realizada cultivando os ovócitos, logo após a aspiração do folículo, em meio de maturação, com temperatura e atmosfera apropriada, por um período de 22-24 horas.

A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas que devem ocorrer simultaneamente e que conferem aos ovócitos a capacidade de serem fecundados, descondensarem a cabeça do espermatozóide, formarem os pró-núcleos e terem desenvolvimento embrionário normal (Dode

et al., 2000a).

Os eventos nucleares envolvem reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (Cha e Chian, 1998).

No que se refere ao citoplasma, ocorre reprogramação na síntese proteica, mudança na atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator promotor da maturação (MPF), bem como no desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca^{++} , e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozóide (Salamone et al., 2001). Ainda durante esse período, ocorrem mudanças na organização citoplasmática, tais como um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios, redução do aparelho de Golgi, aparecimento de vários ribossomos adjacentes aos cromossomos, rearranjo das mitocôndrias e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (Dieleman et al., 2002). O aumento no estoque de lipídios pode estar associado à formação de um

pool de energia essencial para o ovócito suportar o desenvolvimento após a fecundação.

Outro evento que ocorre na maturação é a expansão das células do cumulus que circundam os ovócitos. Essas são células da granulosa especializadas, que estão metabolicamente associadas entre si e com o ovócito. Projeções celulares das células do cumulus atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o ovócito (gap). Essas junções são a única entrada de substâncias ou estímulos no ooplasma. No ovócito imaturo (figura 1), elas estão muito compactadas e, durante a maturação, iniciam a secreção de ácido hialurônico, que se deposita entre elas separando-as e causando a expansão dessas células (figura 2). A ligação metabólica vai diminuindo gradativamente à medida que a expansão aumenta (Warssaman & Al-

bertini, 1994), sugerindo que a presença dessas células seja essencial no período inicial da maturação.

A maturação representa o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação; portanto, as mudanças estruturais e bioquímicas que ocorrem durante esse período são necessárias para que esse processo seja completo. Entretanto, para que isso ocorra, o ovócito precisa ter competência meiótica, que é adquirida progressivamente durante a fase final do crescimento ovocitário. Essa competência se refere à capacidade do ovócito de completar a divisão meiótica, descondensar a cabeça do espermatozóide, formar os pró-núcleos e suportar o desenvolvimento embrionário subsequente (Warssaman & Albertini, 1994). Ovócitos competentes necessitam ter estocado fatores im-

portantes, na forma de proteínas ou RNAm estável, que deverão ser utilizados durante a maturação, fecundação e início do desenvolvimento embrionário (Chan e Chian, 1998).

Tendo em vista que os ovócitos maturados *in vitro*, quando comparados aos *in vivo* apresentam menores taxas de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro* (Takagi et al., 2001), pode-se supor que a maturação ainda continua sendo um problema na PIV. Sendo que, vários fatores podem afetar o sucesso da maturação ovocitária, entre eles podemos citar a morfologia do complexo cumulus-ovócito (CCO), as condições de maturação e a competência do ovócito.

A morfologia dos CCOs tem sido correlacionada com as taxas de blastocistos, a redistribuição das mitocôndrias e o conteúdo de ATP dos ovócitos, os quais diferem entre os considerados morfologicamente bons e ruins. Em ovócitos imaturos morfologicamente superiores, as mitocôndrias aparecem distribuídas de forma uniforme na periferia do citoplasma. Após a maturação, aparecem como grupos maiores localizados não só na periferia mas

também na porção mais central do citoplasma, o que não ocorre nos ovócitos considerados inferiores (Stojkovic et al., 2001). Da mesma forma, o conteúdo de ATP em ovócitos imaturos é maior nos morfologicamente superiores, havendo uma correlação po-

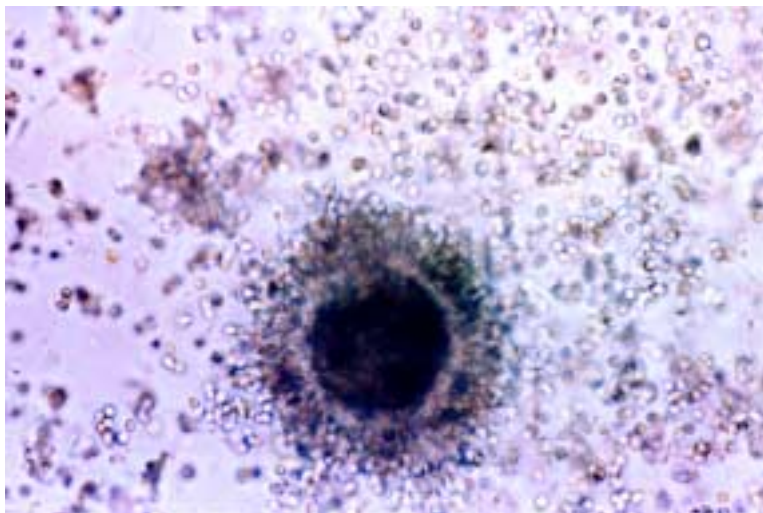


Figura 3 - Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos, em que ovócitos maduros e espermatozoides são co-incubados no meio de fecundação por um período de 12 a 18 horas

sitiva entre a concentração de ATP do ovócito e o número total de células dos embriões produzidos. Esses fatores, entre outros, podem ser responsáveis pela diferença na capacidade de desenvolvimento desses ovócitos.

Além das características morfológicas, as condições de cultivo afetam drasticamente a maturação. A presença de hormônios, substâncias antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa, são alguns fatores que têm sido relatados como responsáveis por muitos dos problemas que ocorrem durante a maturação.

Em bovinos, o crescimento do ovócito está completo quando o folículo atinge em torno de 2 mm de diâmetro e, nesse estágio, alguns ovócitos já estão competentes para se desenvolver *in vitro*. Para a MIV, os ovócitos são coletados, geralmente, de folículos de 2-6 mm, e são maturados *in vitro* por um período de 24 horas. Se compararmos com a situação *in vivo*, folículos desse diâmetro levariam alguns dias até chegarem ao estágio pré-ovulatório. Portanto, esse período que corresponde ao de dominância folicular, é eliminado no cultivo *in vitro*. É possí-

vel que os vários processos, pelos quais os ovócitos passam durante esse período, possam afetar a competência dos ovócitos utilizados para PIV, já que nesses o período final da foliculogênese não ocorre (Dode e Adona 2001; Dieleman et al., 2002). Visando a su-

perar essa situação, várias tentativas têm sido feitas, utilizando agentes fisiológicos e farmacológicos para reter os ovócitos imaturos em meiose (Dode et al. 1999; Adona et al., 2000a; Adona et al., 2000b; Dode et al. 2000b). Essa retenção do núcleo, por um determinado período antes da retomada da meiose daria aos ovócitos uma maior oportunidade para que as mudanças citoplasmáticas necessárias à maturação pudessem ocorrer. Entretanto, até o momento, nenhuma melhora na

produção de embriões tem sido obtida quando os ovócitos são retidos até 24 horas após a aspiração (Dode e Adona, 2001).

Mesmo após a rigorosa seleção de ovócitos e o uso de condições de cultivo adequadas, a taxa de produção de embriões viáveis ainda é o dobro em ovócitos maturados *in vivo* quando comparados com os maturados *in vitro* (Van de Leemput et al., 1999). Portanto, o folículo de origem parece ser vital para conferir aos ovócitos o ambiente necessário para atingir a completa competência para o desenvolvimento. Essa hipótese foi confirmada por Pivato et al. (1999) e Blodin et al. (2002), que utilizaram diferentes protocolos hormonais antes da OPU, e obtiveram ovócitos mais competentes, aumentando o número de embriões produzidos na PIV.

Fecundação *in vitro*

Para a FIV, espermatozoides e ovócitos maduros são co-incubados em um meio específico, por um período em torno de 18 horas (figura 3), sendo possível co-incubar por períodos me-

nores sem afetar as taxas de produção de embriões (Dode et al., 2002a).

Para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os ovócitos tenham sofrido uma maturação completa e que os espermatozoides tenham sido adequadamente preparados.

Para a preparação do sêmen a ser utilizado na FIV, vários métodos para remover o plasma seminal e/ou crioprotetor e melhorar as características seminais têm sido descritos. Entre eles, pode-se citar a lavagem por centrifugação, gradientes de densidade, filtração em coluna de fibra de vidro e migração ascendente. Os mais utilizados são gradiente de densidade utilizando percoll e a migração ascendente, conhecida por swim-up.

O gradiente de percoll, apesar de proporcionar uma maior taxa de recuperação de espermatozoides quando comparado ao swim-up, apresenta grande variação entre partidas, sendo algumas deletérias aos espermatozoides, afetando os resultados da FIV. Embora, o swim-up apresente menor taxa de recuperação, a qualidade espermática é semelhante à obtida com o percoll. Com relação à simples lavagem do sêmen, onde não ocorre seleção espermática, essa tem sido utilizada sem afetar a produção de blastocistos (Avery e Greve, 1995).

Tem sido sugerido que a passagem dos espermatozoides pelo gradiente de percoll poderia retirar algumas glicoproteínas da membrana do espermatozoide e, com isso, acelerar a capacitação. Portanto, poderia ser esperado que o método utilizado poderia alterar o tempo de capacitação e a vida útil do espermatozoide, o que poderia alterar o tempo necessário para a fecundação. Entretanto, estudo comparando os diferentes métodos de preparação espermática em diferentes períodos de co-incubação demonstrou que a variação entre os tempos de duração da FIV foi similar para todos os métodos utili-

zados (Dode et al., 2002a). Os melhores resultados foram observados quando a FIV foi realizada por um período de 12 horas, independente do método utilizado.

Além do método utilizado para preparação do sêmen e do tempo de co-

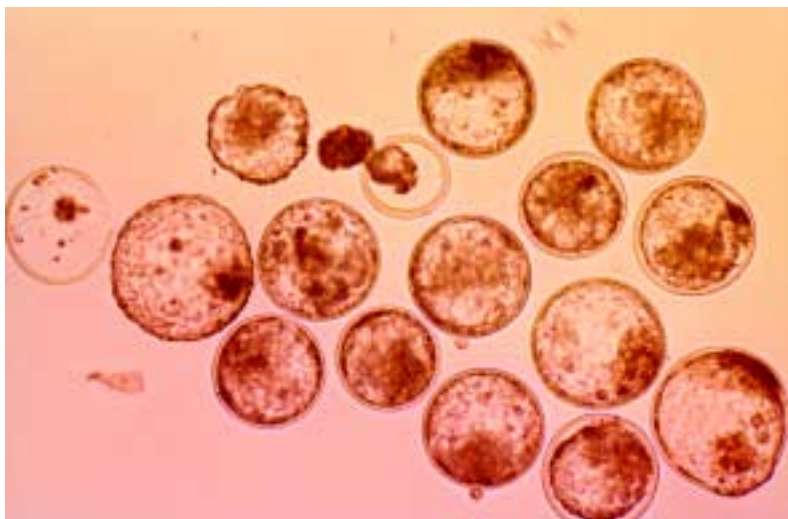


Figura 4 - Embriões bovinos produzidos a partir de ovócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro*

incubação, outros fatores podem afetar a taxa de fecundação tais como a dose inseminante, a interação touro-vaca e a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões. A variação individual de touros é um dos principais fatores que interferem na FIV e produção de embriões. Portanto, é necessário testar os touros antes de seu uso na FIV de ovócitos de diferentes doadoras (Watanabe et al., 1999).

Cultivo de embriões produzidos *in vitro*

Após a fecundação *in vitro*, os embriões são transferidos para o cultivo embrionário onde permanecem por um período de 7 dias, até atingirem o estágio de blastocisto (figura 4), quando, então, podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo.

O cultivo *in vitro* de embriões requer um sistema que suporte um alto desenvolvimento embrionário. O co-cultivo com células somáticas era essencial para se obter taxas aceitáveis de desenvolvimento embrionário. Entretanto, com o desenvolvimento do

meio SOF, que foi criado baseado na constituição do fluido do oviduto de bovinos, foi eliminada a necessidade de co-cultivo, visto que, nesse meio, os zigotos se desenvolvem com boas taxas sem a presença de células somáticas (Watson 2000). Esse meio, contudo,

requer uma atmosfera de 5% de O_2 , a qual difere da utilizada para a MIV e FIV. Estudos têm demonstrado, entretanto, que o meio SOF pode ser utilizado com alta tensão de oxigênio, desde que as células do cumulus remanescentes no zigoto após a FIV sejam mantidas (Dode et al., 2002b). Esses resultados sugerem que as células do cumulus facilitariam o crescimento embrionário por retirarem substâncias tóxicas, diminuindo o estresse oxidativo. Condições de cultivo *in vitro* normalmen-

te aumentam a produção de radicais livres, pois os embriões estão mais expostos a luz e a altas concentrações de O_2 , afetando a taxa de desenvolvimento embrionário.

Comparando os embriões produzidos *in vitro* e os produzidos *in vivo*, foi observado que eles diferem em várias características, tais como aspectos morfológicos, aspectos metabólicos, alterações cromossômicas, número de células e expressão de RNAm específicos (Van Soom et al. 1996; Viuff et al, 1999, 2000). Essas diferenças, possivelmente determinam o começo de uma série de problemas que levam a uma redução na eficiência da técnica (Farin et al., 2001). Os embriões PIV apresentam maior vacuolização, menor número de células, menor densidade de mitocôndrias, maior densidade de lipídios (Crosier et al., 2001) e junções incompletas entre as células do botão embrionário e do trofoblasto (Farin et al., 2001). A maior densidade de lipídios observada nesses embriões sugere que eles retiram mais lipídios do meio de cultivo ou que seu metabolismo estaria alterado. Em estudo utilizando a técnica de FISH para avaliar poliploidias, foi observado que 72%

dos embriões produzidos *in vitro* eram mixoplóides e que, apesar da mixoploidia ocorrer também em embriões *in vivo*, nos *in vitro* ocorre com maior frequência e em estágios mais precoces do desenvolvimento (Viuff et al., 1999). Além disso, a poliploida só foi observada nos *in vitro* e não nos *in vivo* (Viuff et al., 2000, 2001).

Muitos desses problemas são devidos ao processo de maturação, mas que se manifestam no desenvolvimento embrionário, visto que o número de células e as alterações cromossômicas, por exemplo, são diferentes quando os embriões PIV são produzidos a partir de ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* (Van Soom et al., 1996; Viuff et al., 2000, 2001).

Na PIV, cerca de 30% a 50% dos ovócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 35% (Dayan et al., 2000). As maiores perdas no desenvolvimento embrionário ocorrem nos estágios de 8 para 16 células (ativação do genoma do embrião) e pós-transferência, em torno dos dias 14 e 15 da gestação. Quando embriões PIV ou *in vivo* foram transferidos no dia 7 pós-inseminação e recuperados no dia 17 da gestação, foi observado que a degeneração e a perda embrionária foi maior nos embriões PIV (Farin et al., 2001). Esse período coincide com o reconhecimento materno da prenhez, o qual depende de um sinal enviado pelo embrião, o interferon- β , ao organismo materno. De fato, tem sido demonstrado que embriões PIV secretam quantidades menores de interferon- β do que os *in vivo*, sendo que quanto pior a qualidade morfológica do embrião menor a secreção (Stojkovic et al., 1999).

Além do sistema de cultivo usual, outros métodos estão sendo propostos com vistas a aumentar as taxas de produção de blastocisto e os índices de gestação. Entre eles pode-se citar, o sistema de meio seqüencial, em que é realizada uma perfusão para introduzir mudanças na composição do meio de cultivo. Essas mudanças são determinadas de acordo com as mudanças nos requerimentos dos embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Thompson, 1999). E, o cultivo em micro-câmara usando um sistema mi-

crofluídico, que proporciona um ambiente que é mais próximo do sistema *in vivo* do que o sistema estático em micro-gotas. Além disso, esse permite a utilização de meio seqüencial com mudança gradual sem movimentar os embriões (Beebe et al., 2002).

Considerações finais

Apesar do avanço que houve nessa área nos últimos anos, vários aspectos precisam ser ainda esclarecidos. As questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos básicos sobre os diversos mecanismos envolvidos, estão sendo conduzidos no mundo todo. Os resultados desses estudos esclarecerão os aspectos relativos à maior susceptibilidade dos embriões PIV à criopreservação, à menor viabilidade dos ovócitos de bezerras quando comparados aos de vacas e às baixas taxas de prenhez.

É importante salientar também que, por se tratar de uma técnica relativamente nova, o monitoramento rigoroso das doadoras de ovócitos, dos ovócitos, dos embriões e dos produtos nascidos é de fundamental importância para que essa técnica possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais indicadas.

A utilização comercial dessa técnica ainda está limitada ao custo e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (bezerro) e o custo de sua produção. A PIV está sendo gradualmente integrada a programas de melhoramento genético, como uma ferramenta complementar a IA e a TE.

Em termos práticos, o potencial da PIV fica mais evidente quando se discutem suas diferentes aplicações. À medida que o sistema PIV melhora, novas alternativas surgem, como a criopreservação do ovócito e do embrião, a identificação do sexo dos embriões previamente à transferência, a bipartição dos mesmos, visando à produção de gêmeos monozigóticos e à melhoria dos índices de gestação mediante a transferência dos pares para a mesma receptora. O maior impacto da PIV, no entanto, será a sua aplicação associada à sexagem de espermatozoides. Isso porque, com uma dose

inseminante sexada será possível produzir em torno de 30 gestações. Portanto, verdadeiras linhas de produção de embriões sexados poderão ser montadas para a produção de fêmeas, machos e animais com grau de sangue fixo, como, por exemplo, a Girolanda F1.

Referências

- ADONA, P.R., DODE, M.A.N., CHIOCHETTA, L. FERREIRA, C.B. Retenção da meiose em folículos inteiros. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p.192, 2000a.
- ADONA, P.R., DODE, M.A. N., RODOVALHO, N.C.M., FERREIRA, C.B. O uso de líquido folicular para retenção da meiose em ovócitos bovinos. Arq.Fac Vet.UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p.193, 2000b.
- AVERY, B., GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. Theriogenology, 44: 871-878, 1995
- BEEBE, D., WHEELER, M., ZERINGUE, H., WALTERS, E. et al. Microfluidic technology for assisted reproduction. Theriogenology, 57: 125-135, 2002.
- BLODIN, O.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod, 66: 38-43, 2002
- BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., DUROCHER, J. et al. Effect of LH injection before ovum pick-up on in vitro embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. Theriogenology, 53: .347, 2000.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol Reprod, 27: 147-158, 1982.
- CHA, K.Y., CHIAN, R.C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. Human Reproduction Update, 4: 103-120, 1998
- CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J., ALEXANDER, J.E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or in vitro. Biol. Reprod., v.64, p.1375-1385, 2001.

- DAYAN, A., WATANABE, M.R., WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.1, p.181-185, 2000.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. Theriogenology, 57: 5-20, 2002.
- DODE, M.A.N. GODOY, K., ADONA, P.R., FERNANDES, C. Inibição da meiose em ovócitos bovinos cultivados na presença de meios folículos e folículos inteiros. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.1, p.229, 1999.
- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.M.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. Pesq. Agropec. Bras. 35: 207-217, 2000a.
- DODE, M.A.N., ADONA, P.R., RODOVALHO, N.C.M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 241, 2000b.
- DODE, M.A.N., ADONA, P.R. Developmental capacity of *bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. Anim Reprod Science, 65: 157-170, 2001.
- DODE, M.A.N., RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.A. Number and morphology of oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to follicle size, physiological status and season. Archivos de Zootecnia, 50: 415-418, 2001.
- DODE, M.A.N., RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and time of co-incubation on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. Anim Reprod Science, 69: 15-23, 2002a.
- DODE, M.A.N, MATTOS, L., RUMPF, R. In vitro production of embryos in SOF medium under high oxygen tension. Theriogenology, v. 57: 661, 2002b.
- FARIN, P., CROSIER, A.E., FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology, 55: 151-170, 2001.
- GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. Theriogenology, 51: 951-961, 1999.
- PEIXER, M.A.S., RUMPF, R., de BEM, A.R. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultrasonografia em fêmeas super-ovuladas. Arq.Fac Vet.UFRGS, Porto Alegre, v.24, n.1, p.231, 1996.
- PIVATO, I., PEREIRA, D.C., PEIXER, M.A.S., LUCIA Jr., T. et al. O efeito do bST sobre a taxa de recuperação e qualidade dos ovócitos em bovinos. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, v.27, p.171-186, 1999.
- RUMPF, R., DODE, M.A.N., SILVA, A.E.D.F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000, Belo Horizonte: [Anais...]. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2000. p.248-253.
- SALAMONE, D.F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; ROBL, J.M. et al. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. Biol Reprod, 64:1761-1768, 2001.
- STOJKOVIC, M., BÜTTNER, M., ZAKHARTCHENKO, V., RIEDL, J. et al. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. Anim.Reprod.Sci., 55: 151-162, 1999.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Rep, 64: 904-909, 2001.
- TAKAGI, M., KIM, I.H., IZADYAR, F., HYTTTEL, P., BEVERS, M.M. et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. Reproduction, 121: 941-951, 2001.
- THOMPSON, J.G. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. Arq.Fac Vet.UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.1, p. 130-143, 1999.
- VAN de LEEMPUT, E.E., VOSP.L.A.M., ZEINSTR, E.C., BEVERS, M.M. et al. Improvement of in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. Theriogenology, 52: 335-349, 1999.
- VAN SOOM A., BOERJAN, M.L., YSEBAERT, M.T., KUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. Mol. Reprod. Dev, 45: 171-182, 1996.
- VIUFF, D., RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTTEL, P. et al. A high proportion of bovine blastocyst produced in vitro are mixiploid. Biol Reprod, 60: 1273-1278, 1999.
- VIUFF, D., GREVE, T., AVERY, B., HYTTTEL, P. et al. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. Biol.Reprod, 63: 1143-1148, 2000.
- VIUFF, D., HENDRIKSEN, P.J.M., VOS, P.L.A.M., DIELEMANN, S.J. et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. Biol.Reprod, 65: 204-208, 2001.
- WASSARMAN, P.M., ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds). The physiology of reproduction. New York: Raven, 1994. p.79-122.
- WATANABE, Y.F., WATANABE, M.R., DAYAN, A., VILA, R.A., et al. The effect of bull on OPU-IVP in zebu cattle. Arq.Fac Vet.UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.1, p.297, 1999.
- WATSON, A.J., DE SOUSA, P., CAVENEY, A., BARCROFT, L.C. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcriptional levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. Biol Reprod, 62: 355-364, 2000. 